



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
INSTITUTO CARLOS CHAGAS



MARINA REUS TASSI DE ARAUJO

**Expressão de proteínas recombinantes de vírus do gênero  
*Flavivirus*: Aplicação no desenvolvimento de kits de  
diagnóstico e em estratégias antivirais**

CURITIBA

2009

**MARINA REUS TASSI DE ARAUJO**

**Expressão de proteínas recombinantes de vírus do gênero  
*Flavivirus*: Aplicação no desenvolvimento de kits de  
diagnóstico e em estratégias antivirais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração em Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em biologia molecular.

Orientadora: Dra. Claudia N. Duarte dos Santos

CURITIBA  
2009

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná  
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

## PARECER

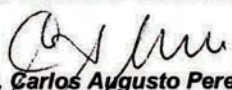
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

  
**Dra. Cláudia Nunes Duarte dos Santos**

Orientadora e presidente da Banca (Instituto de Biologia Molecular do Paraná – IBMP)

  
**Dra. Sonia Mara Raboni**

(Universidade Federal do Paraná - UFPR)

  
**Dr. Carlos Augusto Pereira**  
(Instituto Butantan)


Como Suplente:

**Dr. Juliano Bordignon**

(Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP)

Após argüir o(a) mestrando(a) **Marina Réus Tassi de Araújo** em relação ao seu trabalho de dissertação intitulada: “Expressão de proteínas recombinantes de vírus do gênero *Flavivirus*: aplicação no desenvolvimento de kits de diagnóstico e em estratégias antivirais”, é de parecer favorável à **Aprovação** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de **Mestre** em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título de Mestre está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

  
Curitiba, 20 de agosto de 2009.

**Silvio Sanches Veiga**  
Coordenador do Curso

Aos meus pais, Marcello e Eliane e, ao Marcio,  
por todo carinho, amor, incentivo, confiança e  
paciência depositada em mim.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Marcello e Eliane, pelo contínuo apoio, incentivo, paciência, amor, confiança, carinho e por todos os valores e ensinamentos transmitidos;

À minha família, avós, tios, tias, primos e primas, por todo amor, incentivo e a constante torcida em mais uma etapa de minha vida;

Ao meu namorado, Marcio, pela imensa compreensão e incentivo, amor, amizade, carinho e pelos sonhos compartilhados;

À minha orientadora, Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos, pela oportunidade de fazer parte da equipe, pela paciência e confiança depositadas em mim e pelo incentivo para realização deste trabalho;

Aos meus amigos do laboratório de virologia, Ana Luiza, Daisy, Federico, Florencia, Giovanny, Guilherme, Juliano, Luana, Meg, Meri, Sônia, Suzana e Vanessa, pela disposição a ensinar e ajudar sempre, por todo incentivo, paciência e carinho prestados e, principalmente, por participarem tanto dos êxitos como das frustrações ao longo desses anos. A construção desta dissertação não seria possível sem a “pitada” de cada um de vocês;

Aos ex-integrantes do ICC, Eleonora, Mario e Camilla, por todo apoio e ensinamento passados. Espero que, mesmo distantes, a amizade perdure;

A todos os colegas do ICC, em especial o pessoal da sala de preparo e da secretaria, pela amizade, incentivo, companheirismo e pela oportunidade de fazer parte deste grupo;

Ao Prof. Dr. Luiz Juliano e equipe, da Escola Paulista de Medicina, pela realização dos ensaios funcionais das enzimas de febre amarela;

A CAPES, pelo apoio financeiro;

A todos aqueles que, embora não citados, me apoiaram e participaram, direta ou indiretamente, na elaboração desta dissertação.

“A maior recompensa para o trabalho do  
homem não é o que ele ganha com isso,  
mas o que ele se torna com isso”

*John Ruskin*

## RESUMO

A dengue é, atualmente, uma das principais doenças infecciosas causadas por arbovírus, atingindo milhões de pessoas em todo mundo. Devido a fatores como: inexistência de drogas antivirais e vacinas aprovadas, sintomas iniciais que podem ser confundidos com uma série de outras infecções comuns presentes na mesma área e rápida evolução para formas graves da doença, é fundamental que se tenha disponível um teste diagnóstico rápido, inequívoco e de baixo custo, para o atendimento correto aos indivíduos infectados. Os kits diagnósticos hoje utilizados no Brasil são importados e embora apresentem resultados satisfatórios, são de alto custo. A produção de proteínas recombinantes de cepas de vírus da dengue que circulem no país e a avaliação destes insumos para o desenvolvimento de kits de diagnósticos rápidos, precisos e de custo exequível a realidade do país seria uma alternativa factível. Quanto à febre amarela, apesar da existência de uma vacina altamente eficaz, a prevenção e campanhas se restringem às áreas endêmicas, aumentando a vulnerabilidade da população no caso de uma epidemia. Além disso, a taxa de letalidade é muito alta e também não há nenhuma droga antiviral específica, somente tratamento de suporte. Por apresentar um modelo animal (primata) que reflete as formas clínicas observadas em indivíduos infectados, o vírus da febre amarela constitui um excelente modelo de estudo para ser estendido à outros flavivirus. Assim, o estudo funcional da protease viral do vírus da febre amarela e potenciais inibidores poderiam ajudar no desenvolvimento de drogas terapêuticas, impedindo a replicação do vírus. Baseado nestas premissas, os objetivos principais deste trabalho foram: I. Expressar as proteínas recombinantes de envelope (E), a proteína quimérica pré-membrana e envelope (prM/E) e a não-estrutural 1 (NS1), dos quatro sorotipos do DENV (DENV-1 -2, -3 e -4) utilizando e padronizando o sistema de expressão em linhagens de células S2 de *Drosophila*; II. Padronizar a utilização destas proteínas no desenvolvimento de kits de diagnóstico sorológico de dengue no formato ELISA, para detecção de anticorpos IgM e IgG em amostras de soro de pacientes; III. Paralelamente, produzir a protease recombinante funcional do vírus da febre amarela em sistema procariótico, assim como o controle da protease mutada no sítio ativo, para ensaios de atividade em substratos sintéticos. As proteínas prM/E, E e NS1 dos quatro sorotipos foram corretamente expressas em células S2 de *Drosophila*. O sistema de expressão em células S2 de *Drosophila* foi padronizado assim como a obtenção das linhagens de células transfectadas de forma estável com plasmídeos de expressão de diferentes proteínas recombinantes de dengue. Foram iniciados testes em formato ELISA indiretos, utilizando as proteínas recombinantes purificadas. Foi observada reatividade com soros de pacientes IgG positivos. A protease NS2B/NS3<sub>pro</sub> de febre amarela foi expressa corretamente, purificada e testada quanto a atividade catalítica. Resultados preliminares indicam que a enzima apresenta atividade em substratos sintéticos que mimetizam os sítios de clivagem da poliproteína viral nativa.

Palavras-chave: Dengue. Febre amarela. Expressão de proteínas. Diagnóstico

## ABSTRACT

Currently, dengue is one of the most important mosquito-borne viral disease, afflicting millions of people in the world. Due to factors such as: the inexistence of specific antiviral drugs and approved vaccines, symptoms that can be mistaken with a series of other common infections that are present in the same area, and the rapid progression to severe forms, it is fundamental the availability of a fast, unequivocal and inexpensive diagnosis test to the proper management of patients. Although the diagnosis kits currently in use in Brazil have satisfactory results, all of them are imported and, therefore, imply an elevated cost. The production of DENV recombinant proteins based on strains of the virus present in Brazil and the evaluation of these supplies would be a feasible alternative to the development of rapid and accurate diagnosis kits, with an achievable cost to the country reality. As for the yellow fever, although there is a highly efficient vaccine, the prevention and campaigns are restrict to endemic areas, increasing the vulnerability of the population in the case of an epidemic. Moreover, the lethality rate is very high and the treatment is only supportive, due to the inexistence of specific antiviral drugs. Yellow fever virus constitutes an excellent model of study that can be extended to other flavivirus, because it has an animal model (nonhuman primate) with clinical forms that reflects the ones observed in infected individuals. Thus, the study of the functionality of the yellow fever virus protease and its potential inhibitors could aid in the development of therapeutical drugs, hindering virus replication. Based on these premises, the main objectives of this work were: I. To express envelope (E), the chimera pre-membrane and envelope (prM/E) and non-structural 1(NS1) recombinant proteins, of the DENV four serotypes (DENV-1 -2, -3 and -4), in *Drosophila* S2 cells standardizing the expression of these proteins in the *Drosophila* expression system; II. To standardize the use of these proteins in the development of dengue serological diagnosis kits in the ELISA format, for detection of IgM and IgG antibodies in patients serum samples; III. To produce in the prokaryotic system, in parallel, the functional yellow fever virus recombinant protease, as well as its negative control, the inactive variant of protease, for use in activity assays, with synthetic substrates. The proteins prM/E, E and NS1 of the four types of DENV were correctly expressed in *Drosophila* S2 cells. The *Drosophila* expression system was standardized and stable S2 cells that express a variety of DENV proteins were achieved. Purified recombinant proteins have been tested in indirect ELISA format and positive reaction with patient IgG serum were obtained. Yellow fever NS2B/NS3pro protease was correctly expressed, purified and its catalytic activity tested. Preliminary results indicate that the enzyme displays activity on synthetic substrates which mimic cleavage sites of the native viral poliprotein.

Key words: Dengue. Yellow fever. Protein expression. Diagnosis



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1-</b>	Esquema da organização do genoma de Flavivirus. FONTE: Adaptado de PERERA & KUHN, 2008.....	25
<b>Figura 1.2-</b>	Topologia das proteínas virais nas membranas do RER. FONTE: Adaptado de PERERA & KUHN, 2008.....	26
<b>Figura 1.3-</b>	Estrutura do ectodomínio da proteína de Envelope na partícula madura do vírus da dengue.(a). Disposição da proteína E na superfície do vírus, o peptídeo de fusão é mostrado na cor verde. (b). FONTE: Adaptado de MODIS <i>et al.</i> , 2004 e WHITEHEAD <i>et al.</i> , 2007.....	28
<b>Figura 2.1-</b>	Distribuição geográfica de áreas com risco de transmissão de dengue. FONTE: Adaptado de mapas fornecidos por WHO, 2008.....	34
<b>Figura 2.2-</b>	Esquema demonstrando os níveis de anticorpos específicos anti-dengue IgG (em laranja) e IgM (em rosa), níveis do antígeno NS1 (em roxo) e viremia durante infecções primárias e secundárias (em cinza).FONTE: Adaptado de <a href="http://www.panbio.com">www.panbio.com</a> .....	38
<b>Figura 2.3-</b>	Esquema da metodologia de (A) ELISA Indireto e (B) ELISA de captura. FONTE: Adaptado e modificado de R. A. Goldsby, T. J. Kindt, B. A. Osborne, Kuby Immunology, 4th ed. (W. H. Freeman and Company, 2000), p.162.....	42
<b>Figura 3.1-</b>	Distribuição geográfica de áreas com risco de transmissão de febre amarela. FONTE: Adaptado de mapas fornecidos por WHO, 2008.....	47
<b>Figura 6.1-</b>	Mapa do vetor pMT/BiP/V5-His. FONTE: <a href="http://www.invitrogen.com">www.invitrogen.com</a> .....	65
<b>Figura 6.2-</b>	Mapa do vetor pMT/V5-His. FONTE: <a href="http://www.invitrogen.com">www.invitrogen.com</a> .....	67
<b>Figura 6.3-</b>	Mapa do vetor pMT/V5-His-TOPO. FONTE: <a href="http://www.invitrogen.com">www.invitrogen.com</a> .....	67

<b>Figura 6.4-</b>	Esquema de transfecção transitória e co-transfecção estável de plasmídeos com o gene de interesse em cultura de células S2 e a expressão das proteínas recombinantes. FONTE: Adaptado e modificado de <a href="http://www.invitrogen.com">www.invitrogen.com</a> .....	77
<b>Figura 6.5-</b>	Mapa do vetor pQE-30. FONTE: The Qiaexpressionist, Qiagen .....	86
<b>Figura 6.6-</b>	Esquema de mutagênese da protease. FONTE: Adaptado e modificado do manual QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene.....	90
<b>Figura 7.1-</b>	Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação dos genes prM/E <sub>Δ100</sub> e NS1 (de DENV-1, -2 e -3) e E <sub>Δ100</sub> de DENV-1, -2, -3 e -4.....	92
<b>Figura 7.2-</b>	Eletroforeses em géis de agarose a 0,8% para detecção de plasmídeos recombinantes prM/E <sub>Δ100</sub> , E <sub>Δ100</sub> ou NS1 de DENV-1.....	93
<b>Figura 7.3-</b>	Eletroforeses em géis de agarose a 0,8% para detecção de plasmídeos recombinantes prM/E <sub>Δ100</sub> , E <sub>Δ100</sub> ou NS1 de DENV-2.....	94
<b>Figura 7.4-</b>	Eletroforeses em gel de agarose a 0,8% para detecção de plasmídeos recombinantes prM/E <sub>Δ100</sub> , E <sub>Δ100</sub> ou NS1 de DENV-3.....	95
<b>Figura 7.5-</b>	Eletroforese em gel de agarose a 0.8% para detecção de plasmídeo recombinante E <sub>Δ100</sub> de DENV-4.....	96
<b>Figura 7.6-</b>	Eletroforeses em gel de agarose a 0,8% para confirmação dos possíveis clones de DENV-1, -2, -3 e -4..	97
<b>Figura 7.7-</b>	Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% da amplificação dos genes E <sub>Δ100</sub> <sup>c/STOP</sup> e NS1 <sup>c/STOP</sup> de DENV-3	98
<b>Figura 7.8-</b>	Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação dos genes E <sub>Δ100</sub> <sup>c/STOP</sup> , IsNS1 <sup>c/STOP</sup> e ssNS1 <sup>c/STOP</sup> de DENV-3.....	100
<b>Figura 7.9-</b>	Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação dos genes E <sub>Δ100</sub> <sup>s/ STOP</sup> , IsNS1 <sup>s/ STOP</sup> e ssNS1 <sup>s/STOP</sup> de DENV-3.....	100

<b>Figura 7.10-</b>	Eletoforeses em géis de agarose a 0,8% para detecção de plasmídeos recombinantes E $\Delta_{100}$ de DENV-3.....	102
<b>Figura 7.11-</b>	Eletoforeses em gel de agarose 0,8% para confirmação dos possíveis clones 38, 39, 42 e 22 de DENV-3.....	103
<b>Figura 7.12-</b>	Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação por PCR de colônia dos genes E $\Delta_{100}^{c/STOP}$ , IsNS1 $^{c/STOP}$ e ssNS1 $^{c/STOP}$ de DENV-3.....	103
<b>Figura 7.13-</b>	Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação por PCR de colônia dos genes E $\Delta_{100}^{s/STOP}$ , IsNS1 $^{s/STOP}$ e ssNS1 $^{s/STOP}$ de DENV-3.....	104
<b>Figura 7.14-</b>	<i>Western-Blot</i> imunomarcado com anticorpo anti-V5 e anticorpo secundário anti-camundongo, conjugado com fosfatase alcalina. Os resultados demonstram a expressão da proteína E $\Delta_{100}$ de DENV-4, nas células ( $\phi$ ) e nos meios extracelulares (snd) nos ensaios de cinética de indução.....	106
<b>Figura 7.15-</b>	<i>Western-Blot</i> imunomarcado com anticorpo anti-V5 e anticorpo secundário anti-camundongo, conjugado com fosfatase alcalina. Os resultados demonstram a expressão da proteína E $\Delta_{100}$ de DENV-4, na célula ( $\phi$ ) e no meio extracelular (snd) submetidos à cinética de recolhimento.....	106
<b>Figura 7.16-</b>	<i>Western-Blot</i> imunomarcado com anticorpo anti-V5 e anticorpo secundário anti-camundongo, conjugado com fosfatase alcalina. Os resultados mostram a expressão das proteínas de DENV-1 na célula ( $\phi$ ) e no meio extracelular (snd).....	107
<b>Figura 7.17-</b>	<i>Western-Blot</i> imunomarcado com anticorpo anti-V5 e anticorpo secundário anti-camundongo, conjugado com fosfatase alcalina. Os resultados mostram a expressão das proteínas de DENV-2 na célula ( $\phi$ ) e no meio extracelular (snd).....	108
<b>Figura 7.18-</b>	<i>Western-Blot</i> imunomarcado com anticorpo anti-V5 e anticorpo secundário anti-camundongo, conjugado com fosfatase alcalina. Os resultados mostram a expressão das proteínas de DENV-3 na célula ( $\phi$ ) e no meio extracelular (snd).....	109

<b>Figura 7.19-</b>	<i>Western-Blot</i> imunomarcado com anticorpo anti-V5 e anticorpo secundário anti-camundongo, conjugado com fosfatase alcalina. O resultado mostra a expressão da proteína E $\Delta_{100}$ 2 de DENV-4 na célula ( $\phi$ ) e no meio extracelular (snd).....	109
<b>Figura 7.20-</b>	<i>Western-Blot</i> imunomarcado com anticorpo policlonal anti-DENV3 e anticorpo secundário anti-camundongo, conjugado com fosfatase alcalina. O resultado mostra a expressão das proteínas de DENV-3, geradas a partir de diferentes estratégias abordadas, dos clones E $\Delta_{100}^{c/STOP}$ 38 e ssNS1 $c/STOP$ 17.....	110
<b>Figura 7.21-</b>	Perfil eletroforético de gel SDS-PAGE corado com Azul de Comassie.....	111
<b>Figura 7.22-</b>	<i>Western-blot</i> das proteínas recombinantes DENV-1 E $\Delta_{100}$ 17, DENV-2 E $\Delta_{100}$ 6, DENV-3 E $\Delta_{100}$ 8 e DENV-4 E $\Delta_{100}$ 2. As amostras foram imunomarcadas com anticorpos policlonais contra os DENV-1, -2, -3 e -4, respectivamente, e contra-marcadas com anticorpo anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina.....	111
<b>Figura 7.23-</b>	Análise da porcentagem de células expressando a proteína recombinante prM/E $\Delta_{100}$ 6 de DENV-3 (A) e porcentagem da expressão da proteína quando comparada com o mock (B), após indução com 500, 700 e 1000 $\mu$ M de CuSO $_4$ .....	113
<b>Figura 7.24-</b>	Análise da porcentagem de células expressando a proteína recombinante prM/E $\Delta_{100}$ 6 de DENV-3 (A) e porcentagem da expressão da proteína, quando comparada ao mock (B), após transfecção através de métodos como fosfato de cálcio, ou com reagentes como <i>Cellfectina</i> e <i>Lipofectina</i> .....	114
<b>Figura 7.25-</b>	Expressão da proteína prM/E $\Delta_{100}$ 6 de DENV-3 após a primeira etapa de purificação, diálise (1) ou dessalinização pela coluna PD-10 (2).....	116
<b>Figura 7.26-</b>	Proteína prM/E $\Delta_{100}$ 6 de DENV-3 submetida à segunda etapa de purificação (coluna de afinidade), após diálise...	116

<b>Figura 7.27-</b>	Proteína prM/E $\Delta_{100}$ 6 de DENV-3 submetida à segunda etapa de purificação (coluna de afinidade), após dessalinização.....	117
<b>Figura 7.28-</b>	Proteínas E $\Delta_{100}$ 17 de DENV-1 e E $\Delta_{100}$ 6 de DENV-2 submetidas à purificação, após dessalinização.....	118
<b>Figura 7.29-</b>	Proteínas E $\Delta_{100}$ 8 e prM/ E $\Delta_{100}$ 6 de DENV-3 submetidas à purificação, após dessalinização.....	118
<b>Figura 7.30-</b>	Proteína E $\Delta_{100}^{c/STOP}$ 38 de DENV-3 submetida à purificação, após dessalinização.....	119
<b>Figura 7.31-</b>	Proteína E $\Delta_{100}$ 2 de DENV-4 submetida à purificação, após dessalinização.....	119
<b>Figura 7.32-</b>	Expressão de proteínas recombinantes E $\Delta_{100}$ de DENV-1, -2, -3 e -4 e prM/E $\Delta_{100}$ de DENV-3* após seleção de linhagens estáveis de células S2.....	120
<b>Figura 7.33-</b>	E $\Delta_{100}$ de DENV-1 e -2, prM/E $\Delta_{100}$ de DENV-3 e E $\Delta_{100}$ de DENV-4 submetidas à purificação, após congelamento/descongelamento de células recombinantes estáveis.....	121
<b>Figura 7.34-</b>	<i>Western-Blot</i> da Proteína DomB de DENV-3 submetida à imunomarcção com soros humanos IgG positivos 114, 119, 121, contramarcados com anticorpo secundário anti-humano IgG conjugado com fosfatase alcalina; com soros humanos IgM positivos 111, 118, IVA e KAW, contramarcados com anticorpo secundário anti-humano IgM conjugado com fosfatase alcalina; e com o controle positivo, o anticorpo policlonal anti-DENV3 contramarcado com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina.....	123

<b>Figura 7.35-</b>	<i>Western-Blot</i> das Proteínas prM/E $\Delta_{100}$ (1), E $\Delta_{100}$ (2) e NS1 (3) de DENV-3 submetidas à imunomarcação com soros humanos IgG positivos 114, 119, 121, contramarcados com anticorpo secundário anti-humano IgG conjugado com fosfatase alcalina; com soros humanos IgM positivos 111, 118, IVA e KAW, contramarcados com anticorpo secundário anti-humano IgM conjugado com fosfatase alcalina; e com o controle positivo, o anticorpo policlonal anti-DENV3 contramarcado com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina.....	123
<b>Figura 7.36-</b>	Leitura da densidade óptica a 450nm da especificidade do anticorpo anti- humano IgG contra diferentes concentrações (1, 2, 4, 8 e 16 $\mu\text{g/mL}$ ) do antígeno, a proteína recombinante prM/E $\Delta_{100}$ .....	125
<b>Figura 7.37-</b>	Leitura da densidade óptica a 450nm da especificidade do antígeno, a proteína recombinante prM/E $\Delta_{100}$ , diluída 1:2, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, contra anticorpos anti-humano IgM IVA e KAW.....	126
<b>Figura 8.1-</b>	Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação por PCR dos genes correspondentes aos domínios do co-fator (NS2B), da protease (NS3 <sub>pro</sub> ) e da proteína quimérica do domínio do cofator e da protease (NS2B/NS3 <sub>pro</sub> ).....	128
<b>Figura 8.2-</b>	Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da análise de plasmídeos recombinantes pela técnica de palitagem do DNA correspondente a quimera NS2B/NS3 <sub>pro</sub> clonada em pQE-30.....	129
<b>Figura 8.3-</b>	Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% para confirmação dos clones recombinantes NS2B/NS3 <sub>pro</sub> em pQE-30 através de minipreparação de plasmídeo e digestão dos mesmos.....	130
<b>Figura 8.4-</b>	Análise da expressão e purificação por cromatografia de afinidade da protease NS2B/NS3 <sub>pro</sub> .....	131

<b>Figura 8.5-</b>	Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8 % de reações de PCR do gene correspondente à protease (NS2B/NS3 <sub>pro</sub> ).para seleção de plasmídeos recombinantes, após o processo de mutagênese sítio dirigida.....	133
<b>Figura 8.6-</b>	Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8 % para seleção de clones recombinantes contendo a mutação no sítio catalítico da protease (NS2B/NS3 <sub>pro</sub> ), após a digestão com a endonuclease PstI.....	134
<b>Figura 8.7-</b>	Análise da expressão e purificação por cromatografia de afinidade da protease NS2B/NS3 <sub>pro</sub> mutante.....	135
<b>Figura 8.8-</b>	Atividade relativa da hidrólise de substratos sintéticos de dois ou três aminoácidos básicos, pela protease NS2B/NS3 <sub>pro</sub> .....	136

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1-</b>	Principais métodos empregados atualmente para diagnóstico da Dengue.....	37
<b>Tabela 6.1-</b>	Oligonucleotídeos iniciadores específicos para as proteínas: quimera prM e Envelope, Envelope e NS1 dos sorotipos 1, 2, 3 e 4 do vírus da dengue.....	62
<b>Tabela 6.2-</b>	Amplicons gerados com através de reações de PCR utilizando-se os oligonucleotídeos listados na tabela 3.1. e os vetores em que cada amplicon foi clonado.....	63
<b>Tabela 6.3-</b>	Oligonucleotídeos presentes nos vetores e no genoma de DENV utilizados para as reações de sequenciamento nucleotídico.....	70
<b>Tabela 6.4-</b>	Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação da Protease de VFA e oligonucleotídeos presentes no vetor pQE-30 utilizados para o seqüenciamento.....	84
<b>Tabela 7.1-</b>	Total de clones em fase de leitura obtidos.....	105
<b>Tabela 8.1-</b>	Atividade relativa da hidrólise de substratos sintéticos, baseados em sítios de clivagem da poliproteína viral da febre amarela, pela protease NS2B/NS3 <sub>pro</sub> .....	136



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

¢	Sedimento celular
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
6xHis	Cauda poli-Histidina
ADE	<i>Antibody Dependent-Enhancement</i>
AFRIMS	Instituto de Pesquisa de Ciência Médica das Forças Armadas ( <i>Armed Forces Research Institute of Medical Science</i> )
Ala	Aminoácido Alanina
AP	Fosfatase Alcalina ( <i>Alkaline Phosphatase</i> )
APS	Persulfato de Amônio
Arg	Aminoácido Arginina
Asp	Aminoácido Ácido aspártico
BCIP	5-Bromo-4-Cloro-3-indolyl-fosfato
BSA	Albumina de Soro Bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
CDC	Centros de Controle de Doenças ( <i>Centers for Disease Control</i> )
cDNA	DNA complementar
CF	Fixação do Complemento
Co <sup>++</sup>	Cobalto
CuSO <sub>4</sub>	Sulfato de cobre
DENV	Vírus da Dengue ( <i>Dengue virus</i> )
DEPC	Dietil pirocarbonato
DF	Febre por Dengue
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etileno-diamino tetra-acético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> )

<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>FHD</b>	Febre Hemorrágica por Dengue
<b>Fig(s)</b>	Figura(s)
<b>G</b>	Grama
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
<b>Gln</b>	Aminoácido Glutamina
<b>Gly</b>	Aminoácido Glicina
<b>HBS</b>	Solução salina tamponada com HEPES ( <i>HEPES Buffered Saline</i> )
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HEPES</b>	(N-[2-hidroxietil]-1-piperazino N'-[2-ácido etanosulfônico])
<b>HI</b>	Inibição da Hemaglutinação
<b>His</b>	Aminoácido Histidina
<b>IFI</b>	Imunofluorescência Indireta
<b>IgA</b>	Imunoglobulina do tipo A
<b>IgE</b>	Imunoglobulina do tipo E
<b>IgG</b>	Imunoglobulina do tipo G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina do tipo M
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-tiogalactopirósídeo
<b>JEV</b>	Vírus de encefalite japonesa ( <i>Japanese Encephalitis virus</i> )
<b>kb</b>	1000 pares de base
<b>KCl</b>	Cloreto de Potássio
<b>kDa</b>	Quilo Dalton
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de Potássio
<b>LB</b>	Meio Luria Broth
<b>Lys</b>	Aminoácido Lisina
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Miliampére
<b>Mab</b>	Anticorpo monoclonal
<b>MAC/ELISA</b>	<i>IgM Antibody-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>mg</b>	Miligrama
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnésio

<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de Magnésio
<b>min</b>	Minuto(s)
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato de Dissódico
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio
<b>NBT</b>	<i>Nitro-Blue-Tetrazolium</i>
<b>NC</b>	Região não codante
<b>ng</b>	Nanograma
<b>NP-40</b>	Nonil fenoxi polietoxietanol
<b>Nt</b>	Nucleotídeos
<b>NT</b>	Teste de Neutralização
<b>O.D</b>	Densidade Ótica no comprimento de onda ( $\lambda$ )
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Solução Salina tamponada com Fosfato ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da Polimerase ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
<b>r.p.m</b>	Rotações por minuto
<b>RE(R)</b>	Retículo Endoplasmático (rugoso)
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RT/PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase associada à transcrição reversa
<b>S2</b>	Células de <i>Drosophila melanogaster</i>
<b>SCD</b>	Síndrome do Choque por Dengue
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato Sódio ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de acrilamida contendo SDS ( <i>Sodium dodecyl sulfate -polyacrilamide gel electrophoresis</i> )
<b>seg</b>	Segundo(s)
<b>Ser</b>	Aminoácido Serina

<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>snd</b>	Sobrenadante
<b>SVS</b>	Secretaria de Vigilância em Saúde
<b>TBE</b>	Tris Boro EDTA
<b>TBEV</b>	Vírus da Encefalite transmitida por Carrapato ( <i>Tick-borne encephalitis virus</i> )
<b>TBS</b>	Solução Salina tamponada com Tris ( <i>Tris Buffered Saline</i> )
<b>TE</b>	Tampão Tris-EDTA
<b>TEMED</b>	N, N, N', N' - Tetrametiletilenodiamina
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>U</b>	Unidade (s)
<b>V</b>	Volts
<b>VFA</b>	Vírus da Febre Amarela
<b>WHO</b>	Organização Mundial de Saúde ( <i>World Health Organization</i> )
<b>WNV</b>	Vírus do Oeste do Nilo ( <i>West Nile virus</i> )
<b>x g</b>	Aceleração da gravidade
<b>pmol</b>	Picomol

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO FLAVIVIRUS.....</b>	<b>23</b>
1.1 Genoma Flavivirus.....	23
1.2 Ciclo viral.....	24
1.3 Proteínas virais.....	26
<b>2. VIRUS DA DENGUE (DENV).....</b>	<b>31</b>
2.1 Histórico.....	31
2.2 Vetor e ciclo de transmissão.....	32
2.3 Epidemiologia.....	33
2.4 Fatores clínicos da doença.....	34
2.5 Prevenção e tratamento.....	35
2.6 Diagnóstico.....	36
2.6.1 Isolamento viral.....	38
2.6.2 Detecção do genoma viral.....	39
2.6.3 Sorologia.....	40
2.6.4 Detecção do antígeno.....	44
<b>3. VIRUS DA FEBRE AMARELA (VFA).....</b>	<b>45</b>
3.1 Histórico.....	45
3.2 Vetor e ciclo de transmissão.....	46
3.3 Epidemiologia.....	46
3.4 Fatores clínicos da doença.....	47
3.5 Prevenção e tratamento.....	48
3.6 Diagnóstico.....	49
<b>4. SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE DENV E VFA.....</b>	<b>50</b>
<b>5. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
<b>6. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
6.1 Materiais.....	55
6.1.1 Soluções e Tampões.....	55
6.1.2 Meios de Cultura.....	56
6.1.3 Linhagens bacterianas de <i>E.coli</i> .....	57
6.1.4 Linhagens Celulares.....	57
6.1.5 Cepas virais.....	58
6.1.6 Oligonucleotídeos.....	58
6.1.7 Plasmídeos.....	58
6.1.8 Anticorpos.....	59

6.2 Metodologias para expressão de proteínas recombinantes de DENV no sistema de <i>Drosophila</i> .....	59
6.2.1 Reação da transcriptase Reversa (RT).....	59
6.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para DENV.....	60
6.2.3 Clonagem de genes (prM/EΔ <sub>100</sub> de DENV-1, -2 e -3, EΔ <sub>100</sub> de DENV-1, -2, -3 e -4, NS1 de DENV-1, -2 e -3 e EΔ <sub>100</sub> <sup>c/STOP</sup> , NS1 <sup>c/STOP</sup> , ssNS1 <sup>c/STOP</sup> , lsNS1 <sup>c/STOP</sup> , EΔ <sub>100</sub> <sup>s/STOP</sup> , ssNS1 <sup>s/STOP</sup> e lsNS1 <sup>s/STOP</sup> de DENV-3) e ligação aos vetores de expressão.....	64
6.2.4 Transformação de plasmídeos em linhagens bacterianas <i>E.coli</i> .....	68
6.2.5 Seleção dos clones recombinantes.....	68
6.2.6 Minipreparação e seqüenciamento.....	69
6.2.7 Transfecção transitória de clones recombinantes em células S2 de <i>Drosophila</i> .....	70
6.2.8 Padronização da expressão de proteínas heterólogas no sistema de células de <i>Drosophila</i> .....	73
6.2.9 Ensaios de citometria de fluxo.....	75
6.2.10 Seleção de linhagens estáveis de células S2.....	76
6.2.11 Processo de congelamento das linhagens estáveis de células recombinantes.....	78
6.2.12 Ensaio de Purificação da proteína recombinante prM/EΔ <sub>100</sub> de DENV-3.....	79
6.2.13 Purificação de proteínas de EΔ <sub>100</sub> de DENV-1,-2,-3 e -4 e prM/EΔ <sub>100</sub> de DENV-3.....	80
6.2.14 <i>Western-blot</i> de proteínas recombinantes para teste com soros humanos.....	81
6.2.15 Teste sorológico tipo ELISA com antígeno recombinante prM/EΔ <sub>100</sub> de DENV-3.....	82
6.3 Metodologias para expressão da protease recombinante em <i>E.coli</i> .....	83
6.3.1 Reação da Transcriptase Reversa (RT) e PCR.....	83
6.3.2 Clonagem da quimera NS2B/NS3 de VFA no vetor pQE-30....	84
6.3.3 Expressão da protease recombinante.....	86
6.3.4 Purificação da protease recombinante.....	87
6.3.5 Mutagênese da protease.....	88
<b>7. RESULTADOS DENV.....</b>	<b>91</b>
7.1 Clonagem dos genes prM/E, E e NS1 de DENV-1, -2, -3 e -4.....	91
7.2 Padronização e expressão de proteínas recombinantes através da transfecção em células de <i>Drosophila</i> .....	105
7.3 Padronização da quantidade de CuSO <sub>4</sub> e metodologias de transfecção através da análise em citômetro de fluxo.....	112
7.4 Purificação de proteínas recombinantes.....	115
7.5 Expressão de proteínas de Envelope após a seleção de linhagens estáveis de células S2.....	120

7.6	Purificação de proteínas após o processo de congelamento das linhagens estáveis de células recombinantes.....	121
7.7	Análise da imunogenicidade das proteínas recombinantes para teste com soros humanos de pacientes.....	122
7.8	Teste sorológico tipo ELISA com antígeno recombinante prM/E $\Delta_{100}$ de DENV-3.....	124
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS EXPRESSÃO FUNCIONAL DA PROTEASE RECOMBINANTE DE VFA.....</b>	<b>127</b>
8.1	Clonagem da protease quimérica (NS2B/NS3 <sub>pro</sub> ) em <i>E.coli</i> .....	127
8.2	Expressão de purificação da protease quimérica (NS2B/NS3 <sub>pro</sub> ).....	130
8.3	Mutagênese do sítio ativo da protease quimérica (NS2B/NS3 <sub>pro</sub> ).....	132
8.4	Análise funcional da serina protease (NS2B/NS3 <sub>pro</sub> ) do vírus de febre amarela.....	135
<b>9.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>137</b>
9.1	Proteínas Recombinantes de Dengue.....	137
9.2	Protease de Febre Amarela.....	146
<b>10.</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>148</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>150</b>

## 1. INTRODUÇÃO FLAVIVIRUS

Os vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, estão distribuídos na maior parte das regiões tropicais e sub-tropicais do mundo. Os membros dessa família de vírus que tem como vetor mosquitos ou carrapatos, são denominados arbovírus (*arthropod-borne virus*). O gênero compreende mais de 56 membros, a maioria relacionada com manifestações patológicas em humanos, animais domésticos e pássaros (HEINZ; ALLISON, 2000). Mais de 50% estão associados com doenças em humanos sendo que os principais são os vírus da dengue (DENV), febre amarela (VFA), encefalite japonesa (JEV), oeste do Nilo (WNV) e encefalite transmitida por carrapato (TBEV) (GUBLER, 2007). Neste trabalho serão descritos em maiores detalhes os vírus da dengue e de febre amarela.

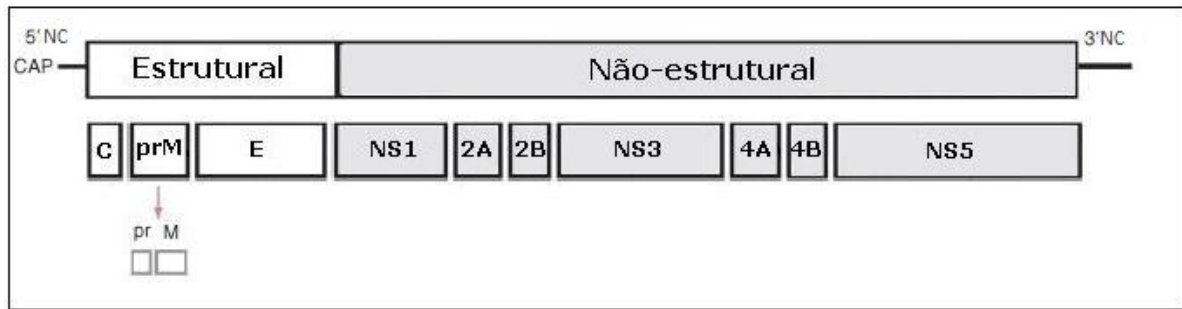
### 1.1 Genoma dos *Flavivirus*

Os virions maduros dos *Flavivirus* são esféricos, medem entre 40 e 60 nm de diâmetro e apresentam simetria icosaédrica (MURPHY, 1980; LINDENBACH; RICE, 2003). Apresentam um envelope derivado da célula hospedeira e no qual estão inseridos dois tipos de proteínas, a proteína de Envelope (E) e a proteína de membrana (M), ou sua precursora (prM). Possuem um nucleocapsídeo que consiste de várias cópias da proteína de capsídeo (C) e uma molécula de RNA de aproximadamente 11.000 nucleotídeos (RICE, 1996), de fita simples, e de polaridade positiva (+ssRNA), sendo desta forma infeccioso. O RNA genômico possui na extremidade 5', uma região não codante (NC) de aproximadamente 120 nucleotídeos, além de uma estrutura de "cap" tipo I (m7GpppAmp). A região 3' apresenta uma região NC de aproximadamente 500 nucleotídeos e não é poliadenilada (CHAMBERS *et al.*, 1990a; LINDENBACH; RICE, 2001), porém, os últimos 90 nucleotídeos formam uma estrutura secundária conservada (BRINTON; FERNANDEZ; DISPOTO, 1986). As regiões 5' e 3' NC do vírus da dengue parecem desempenhar importante papel na iniciação e modulação da tradução e replicação do genoma viral (ALVAREZ *et al.*, 2006; CHIU; KINNEY; DREHER, 2005).



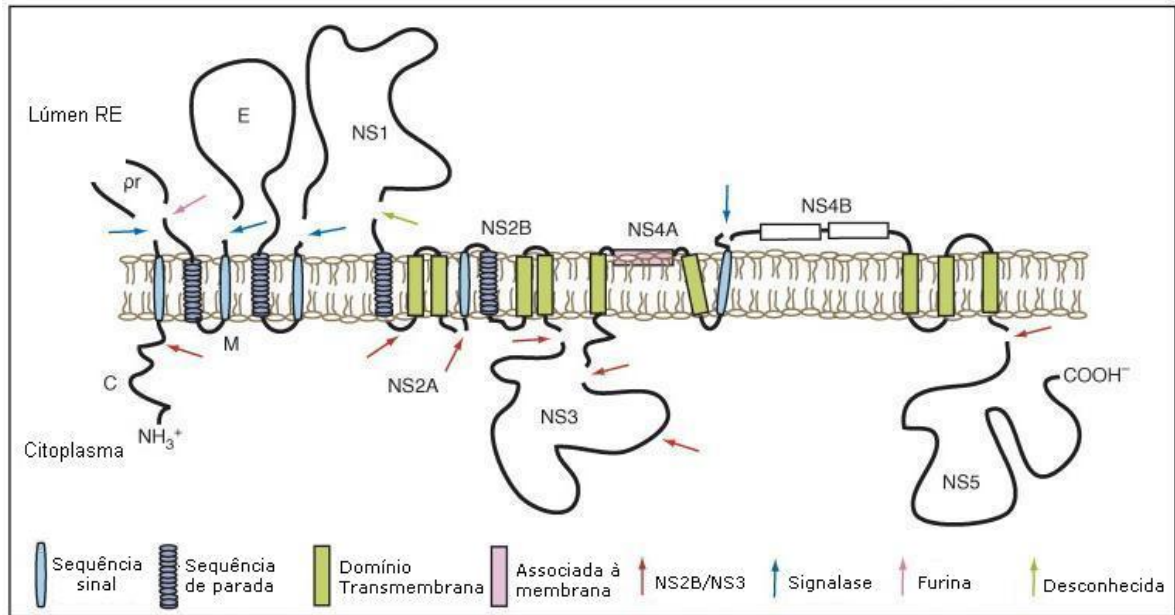
## 1.2 Ciclo viral

Os *Flavivirus* entram nas células hospedeiras por endocitose mediada pela interação com receptores (LINDEBACH; RICE, 2003). O baixo pH do ambiente do endossomo resulta em mudanças conformacionais na proteína E expondo o peptídeo de fusão, permitindo a fusão com a membrana do endossomo e a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Depois da desmontagem da partícula, o genoma viral é liberado e traduzido a partir de uma única fase de leitura aberta que codifica para uma poliproteína de aproximadamente 3.400 aminoácidos, que é clivada co-traducionalmente por proteases virais e celulares (HEINZ; ALLISON, 2003). As três proteínas estruturais (C, prM e E) são codificadas no primeiro terço do genoma enquanto os dois terços seguintes codificam para sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (CHAMBERS *et al.*, 1990a; RICE, 1996), representadas pela figura 1.1. A porção amino-terminal (N-terminal) das proteínas prM, E, NS1 e NS4B são geradas por clivagens pela protease sinalase da célula hospedeira, no lúmen do retículo endoplasmático, enquanto a maioria das porções carbóxi- terminais (C-terminais) das proteínas são geradas por clivagens pela serina-protease viral, composta pelas proteínas NS2B/NS3 (CHAMBERS *et al.*, 1990b; FALGOUT *et al.*, 1991). Durante o processo de tradução da poliproteína, algumas proteínas virais são translocadas ao retículo endoplasmático através de várias sequências-sinais e, ancoradas no mesmo através de seus domínios de ancoragem à membrana (Figura 1.2). A proteína C contém uma sequência sinal hidrofóbica em sua porção C-terminal, que transloca a proteína prM para o lúmen do RE. A prM, por sua vez, contém dois domínios transmembrana, um com sinal de retenção e outro com uma sequência sinal, resultando na translocação da proteína E ao lúmen do RE. Por fim, uma sequência sinal na porção carboxila da E, é responsável pela translocação da proteína NS1 ao RE (FALGOUT; CHANOCK; LAI, 1989).



**Figura. 1.1.** Esquema da organização do genoma de Flavivirus. O genoma viral é um ssRNA+ de aproximadamente 11kb. Apresenta um cap na região 5'NC porém não apresenta cauda poliadenilada em sua região 3'. As proteínas estruturais C, prM e E (Caixas brancas) são traduzidas a partir do primeiro terço do genoma, seguidas pelas proteínas não estruturais NS1, NS2A e B, NS3, NS4A e B e NS5 (caixas cinzas). FONTE: Adaptado de PERERA; KUHN, 2008

A RNA polimerase viral dependente de RNA (NS5) se liga à proteínas virais e celulares para formar o complexo de replicação. A replicação é semiconservativa, na qual o RNA de polaridade positiva serve como modelo para a síntese da molécula de RNA de polaridade negativa para que assim sejam gerados outros RNAs de polaridade positiva (WESTAWAY, 1987). Depois da replicação, o genoma viral é encapsidado pela proteína de capsídeo e direcionado à superfície do RE, onde o nucleocapsídeo é envolvido por uma bicamada lipídica embebida com as proteínas prM e E, resultando em um vírus imaturo, não infeccioso, que é transportado através das redes de Golgi, onde ocorre a glicosilação de prM, E e NS1. A clivagem da glicoproteína prM para gerar a proteína M é feita por uma protease tipo furina, em um estágio tardio da morfogênese viral (STADLER *et al.*, 1997), ocorrendo como última etapa antes da liberação dos virions maduros pela célula hospedeira (CHAMBERS *et al.*, 1990a; RICE, 1996). Esta maturação é necessária para manter a conformação da proteína E, sem expor o peptídeo de fusão durante o transporte pelas cisternas do Golgi, que apresentam um pH ácido, e assim, manter o potencial de infectividade dos vírus (HEINZ; ALLISON, 2003).



**Figura 1.2.** Topologia das proteínas virais nas membranas do RER. O RNA viral é traduzido em uma poliproteína, que é processada por proteases virais e celulares (flechas). As proteínas estruturais prM e E são liberadas da poliproteína através de uma clivagem por signalase no RE, mas permanecem ancoradas no lado luminal da membrana. A proteína C também é ancorada na membrana do RE (pelo lado citoplasmático) por uma sequência sinal conservada em sua porção C-terminal. Esta sequência sinal é clivada pela protease viral. Durante a maturação da partícula viral, a prM é clivada por uma protease tipo furina no complexo de Golgi para gerar a proteína M. As proteínas não estruturais são clivadas principalmente pela protease viral no citoplasma, com exceção da NS1, que é liberada da NS2A no RE por uma protease desconhecida. NS2A/2B e NS4A/4B são ancoradas no RE como proteínas trans-membrana. FONTE: Adaptado de PERERA; KUHN, 2008.

### 1.3 Proteínas virais

A proteína do capsídeo (C) é responsável pela estrutura da partícula viral, possui uma massa molecular de 11 kDa e caráter básico, se ligando fortemente à moléculas de RNA (CHAMBERS *et al.*, 1990a). Jones *et al.* (2003), demonstraram que a proteína recombinante C, quando expressa em *E. coli* apresenta  $\alpha$ -hélices e forma dímeros. Kiermayr *et al.* (2004), demonstraram que esta dimerização é induzida pela interação com moléculas de DNA ou RNA, e que a região C-terminal da proteína estaria envolvida na associação ao RNA viral (MA *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2002).

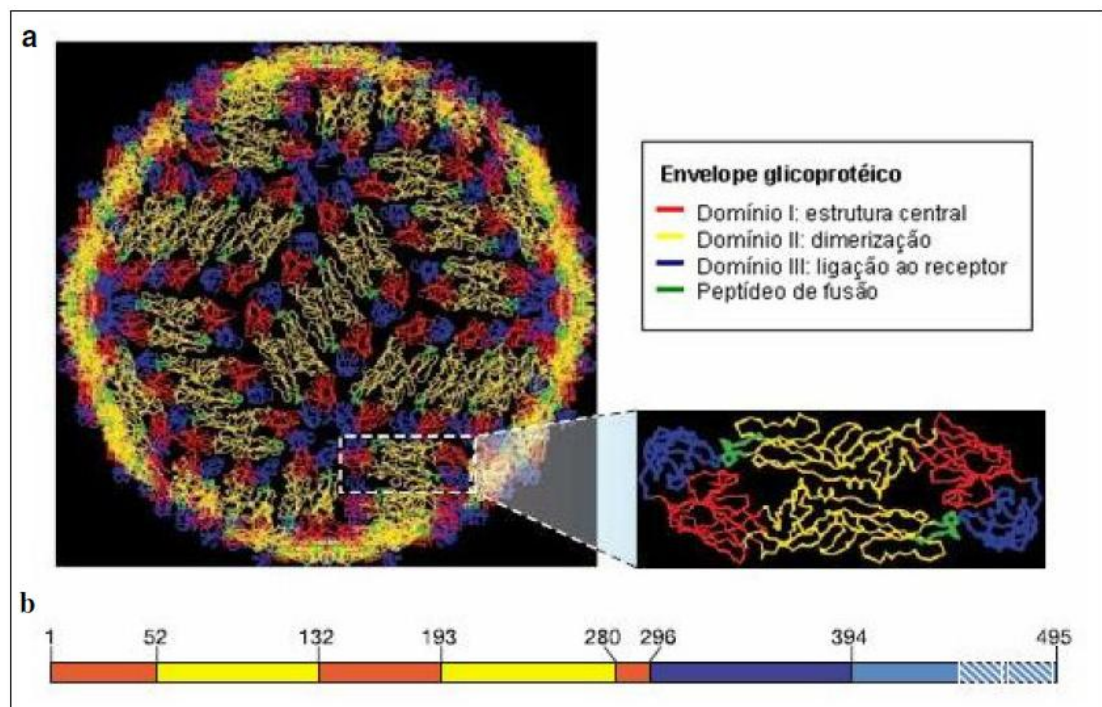
A glicoproteína prM (26 kDa), faz parte da estrutura dos virions imaturos e sua clivagem, gerando a proteína M (8 kDa), produz partículas virais maduras. Sítios de N-glicosilação potenciais e sua localização são conservados entre os sorotipos de DENV (Asn<sub>69</sub>) enquanto VFA apresenta três potenciais sítios dentro da região pr e um na região C-terminal de M, este último provavelmente não utilizado por sua localização em um domínio transmembrana (CHAMBERS *et al.*, 1990a). Estudos revelaram que anticorpos contra a proteína prM são capazes de proteger camundongos contra infecção pelo vírus da dengue (KAUFMAN *et al.*, 1989), assim como peptídeos sintéticos de domínios das proteínas prM e M são capazes de induzir anticorpos neutralizantes e proteger camundongos (VAZQUEZ *et al.*, 2002).

A proteína de envelope (E), de aproximadamente 60 kDa, é a maior proteína estrutural do virion, sendo responsável pelas principais propriedades biológicas do vírus. Além de ser o principal componente antigênico viral, a proteína E age como hemaglutinina viral, apresenta capacidade fusogênica com membranas da célula hospedeira, induz resposta imune protetora e interage com receptores na superfície das células-alvo (CHEN *et al.*, 1997; MODIS *et al.*, 2004). Evidências indicam que a proteína E desempenha um papel na patogenicidade de diversos flavivírus, não apenas pela definição do tropismo celular, também como pela entrada do vírus na célula-alvo (GOLLINS ; PORTERFIELD, 1986; REY *et al.*, 1995; MODIS *et al.*, 2004). É uma proteína de fusão classe II e compartilha aproximadamente 40% de identidade aminoacídica entre os *Flavivirus* (PERERA; KHALIQ; KUHN, 2008). A estrutura atômica do ectodomínio (resíduos 1-395) já foi determinado para os vírus DENV-2, DENV-3, WNV e TBEV (KANAI *et al.*, 2006; MODIS *et al.*, 2003, 2004, 2005; NYBAKKEN *et al.*, 2006; REY *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 2004), sendo muito similares (Figura 1.3). Sua estrutura consiste de um dímero, no qual cada monômero têm 3 domínios em fitas  $\beta$ . O domínio central (domínio I) contém a região N-terminal e é flanqueado em um lado pelo domínio II. Este domínio deriva de duas regiões (aminoácidos 50-125 e 200-250), é alongado, medeia a dimerização da E, e contém um peptídeo de fusão hidrofóbico conservado em sua extremidade distal (ALLISON *et al.*, 2001).

O domínio III, tipo imunoglobulina, compreende os aminoácidos 300 a 395 e parece estar envolvido na ligação ao receptor (BHARDWAJ *et al.*, 2001; REY *et al.*, 1995) e neutralização de anticorpos (BEASLEY ; BARRETT, 2002; HALSTEAD *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005; PIERSON *et al.*, 2007). Embora todos os domínios

tenham epítomos envolvidos em neutralização e inibição da hemaglutinação, somente o domínio II contém epítomos de reação cruzada entre os Flavivirus (CHAMBERS et al, 1990a).

A proteína E do vírus da dengue é glicosilada em determinados resíduos de aminoácidos. Os principais sítios de glicosilação encontram-se especialmente próximas ao domínio III da proteína. No entanto, o número e a posição de resíduos glicosilados não são conservados entre os vírus de diferentes cepas e entre flavivirus, o que sugere que esses carboidratos modificados na superfície do vírus modulam a especificidade do ligante ao receptor alvo (JOHNSON; GUIRAKHOO; ROEHRIG, 1994; MUKHOPADHYAY; KUHN; ROSSMANN, 2005).



**Figura 1.3.** Estrutura do ectodomínio da proteína de Envelope na partícula madura do vírus da dengue. **(a).** Disposição da proteína E na superfície do vírus, em verde, o peptídeo de fusão. **(b).** Os domínios I, II e III da proteína E estão representados nas cores vermelho, amarelo e azul, respectivamente. As linhas brancas transversais indicam os 53 resíduos de aminoácidos que constituem a âncora hidrofóbica que liga a região C-terminal da proteína E com o ectodomínio da proteína. Fonte: Adaptado de MODIS *et al.*, 2004 e WHITEHEAD *et al.*, 2007.

As proteínas não estruturais estão envolvidas na modulação da resposta do hospedeiro e na replicação do RNA viral (LIU *et al.*, 2004; KHROMYKH; WESTAWAY, 1997). Em somatória, podem desempenhar funções na montagem, organização e liberação do vírus (LINDEBACH ; RICE, 2001 e 1999; KUMMERER ; RICE, 2002). A proteína NS3 (68 kDa), é uma proteína multifuncional, altamente conservada entre os flavivirus e tem no mínimo três atividades bioquímicas distintas. Os primeiros 180 aminoácidos da região N-terminal da NS3 (NS3<sub>pro</sub>) associados à proteína NS2B (co-fator) apresentam atividade de serina-protease, catalisando as clivagens de várias das proteínas virais como NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A, NS4B-NS5 (CHEN *et al.*, 1997; LI *et al.*, 1997; CUI *et al.*, 1998; KHROMYKH *et al.*, 1999; KHROMYKH; SEDLAK; WESTAWAY, 1999; LINDENBACH; RICE, 2003). A protease viral tem preferência por dois resíduos básicos de aminoácidos (Arg-Arg, Arg-Lys, Lys-Arg e ocasionalmente Gln-Arg) nas posições P2 e P1 que precedem o sítio de clivagem, seguidos por Gly, Ala ou Ser na posição P1' (CHAMBERS *et al.*, 1990b). Bazan e Fletterick (1989) e Gorbalenya *et al.* (1989), demonstraram, através de alinhamentos de sequência de aminoácidos, que a serina-protease dos flavivirus apresentava homologia com enzimas da família tripsina. Em adição, sequências de enzimas celulares e bacterianas desta família, quando alinhadas com sequências de NS3<sub>pro</sub> de diversos flavivirus, compartilharam resíduos de aminoácidos altamente conservados, incluindo os resíduos envolvidos na catálise e na ligação ao substrato (BAZAN E FLETTERICK, 1989). A região C-terminal da proteína NS3 (a partir do aminoácido 181) apresenta atividade de helicase (NS3<sub>hel</sub>), envolvida na replicação do RNA viral e RNA 5'-trifosfatase, envolvida na formação do *cap* na extremidade 5' do genoma (WENGLER; WENGLER, 1991; KHROMYKH *et al.*, 1999; KHROMYKH; SEDLAK; WESTAWAY, 1999; LINDENBACH ; RICE, 2003).

A proteína NS5 é a maior das proteínas não estruturais, com cerca de 100 kDa e apresenta seqüências altamente conservada entre todos os *flavivirus*. Existem dois diferentes motivos, GDD e SAM, responsáveis pela atividade de RNA polimerase dependente de RNA (polimerase viral) e de metiltransferase, respectivamente (KAMER ; ARGOS, 1984; CHAMBERS *et al.*, 1990a; KOONIN, 1993; LINDENBACH ; RICE, 2003).

A proteína NS1, com aproximadamente 45 kDa, pode ser encontrada associada à superfície celular e no meio extracelular de células infectadas de mamíferos (WINKLER *et al.*, 1988 e 1989; FLAMAND *et al.*, 1999), o que pode

explicar a produção de anticorpos contra esta proteína, detectada em soro de pacientes antes mesmo do RNA viral ser detectado por RT-PCR (ALCON *et al.*, 2002). A NS1 também é capaz de fixar complemento e transduzir sinais em células infectadas, o que poderia contribuir para a patogênese da doença (JACOBS *et al.* 2000), porém, a função direta na replicação viral ainda é desconhecida (LINDENBACH ; RICE, 1999; KHRAMYKH *et al.*, 1999; MACKENZIE *et al.*, 1998; WESTAWAY; MACKENZIE; KHRAMYKH, 2003). Estudos revelaram que imunização com NS1 nativa ou recombinante assim como imunização passiva com anticorpos monoclonais anti-NS1, protege camundongos frente à infecção com flavivirus homólogos (MACKENZIE; JONES; YOUNG, 1996; SCHLESINGER; BRANDRISS; WALSH, 1987; ZHANG *et al.*, 1988; HENCHAL; HENCHAL; THAISOMBOONSUK, 1987; BRAY *et al.*, 1989; CANE; GOULD, 1988). A proteína NS1 dos flavivirus apresenta 12 resíduos de cisteína conservados (com exceção de DENV-4), dois sítos de N-glicosilação invariáveis (com exceção de alguns membros, como TBEV), assim como regiões de alta homologia entre as sequências de diversos flavivirus (CHAMBERS *et al.*, 1990a).

A proteína NS2A, de 24 kDa, é a primeira das quatro pequenas proteínas hidrofóbicas (NS2A, NS2B, NS4A e NS4B). O perfil hidrofóbico dessas proteínas sugere uma possível interação com membranas (CHAMBERS *et al.*, 1990a; BRINKWORTH *et al.*, 1999). Estudos com o flavivirus Kunjin (KUN) demonstraram que a NS2A tem alta especificidade pela região NC da extremidade 3' e por outros componentes importantes na formação do complexo de replicação (MACKENZIE *et al.*, 1998), além de exercer funções na modulação do interferon antiviral produzido pelo hospedeiro (LIU *et al.*, 2004 e 2005). Outros estudos, também utilizando o vírus KUN e VFA, mostraram que mutações na proteína interferem na montagem e secreção da partícula viral pela célula hospedeira (LIU; CHEN; KHRAMYKH, 2003; KUMMERER; RICE, 2002).

A proteína NS2B, de 14 kDa, é essencial para a atividade de protease da NS3<sub>pro</sub> (LIN *et al.*, 1993; FALGOUT *et al.*, 1991; CHAMBERS *et al.*, 1990b). Não se têm evidências diretas sobre a função das proteínas NS4A e NS4B. No entanto, estudos recentes sugerem que a proteína NS4A está ancorada à membrana do retículo e interage com as proteínas NS1, NS3 e NS5 (WESTAWAY; MACKENZIE; KHRAMYKH, 2003). Alguns estudos demonstram que durante a replicação viral, a proteína NS4B pode estar localizada no núcleo da célula hospedeira, e parece estar

envolvida na inibição da síntese de interferon, mas seu papel ainda não foi determinado (LINDENBACH ; RICE, 2003).

## 2. VÍRUS DA DENGUE (DENV)

### 2.1 Histórico

Acredita-se que as primeiras epidemias de dengue ocorreram em 1779 no Cairo (Egito) e em Jacarta (Indonésia). Em 1780, Benjamin Rush observou na Filadélfia uma doença similar, a qual denominou de “febre quebra-ossos” (*break-bone fever*) (RUSH, 1789). Estes casos indicaram que o agente etiológico e o vetor tinham uma distribuição abrangente, especialmente nas regiões tropicais. Em 1903, Graham apontou a importância do *Aedes aegypti* na transmissão do agente, o que foi confirmado anos depois (CLELAND; BRADLEY; MCDONALD, 1919; CHANDLER; RICE, 1923) e, em 1907, Ashburn e Craig reconheceram a etiologia viral da febre clássica da dengue (DF).

A Segunda Guerra Mundial causou uma grande mudança ecológica no Sudeste da Ásia e Pacífico, criando as condições ideais para aumento da população e distribuição geográfica de *A. aegypti*, assim como aumento de pessoas suscetíveis à transmissão por DENV (GUBLER, 1998). Os eventos da guerra resultaram em pesquisas para estudar a doença e seu agente etiológico. Em 1952, Hotta, Kimura, Sabin e Schlesinger conseguiram isolar o vírus da dengue (DENV) a partir de soro humano através de inoculação em camundongos. A imunidade homotípica de infecções sucessivas foi caracterizada, pela identificação de dois sorotipos, DENV-1 e DENV-2, que foram usados para produzir vacinas experimentais, após passagem seriada em cérebro de camundongo (HOTTA, 1952; SABIN, 1952). Os outros dois sorotipos, DENV-3 e DENV-4, foram isolados após uma epidemia de dengue em 1956 nas Filipinas (HAMMON; RUDNICK; SATHER, 1960).

Nos anos 50 e 60, casos de dengue eram raros nas Américas devido ao programa de erradicação do *A. aegypti* pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (GUBLER, 1989 e 1997). No início dos anos 70 o programa foi interrompido, e nos anos 90, o vetor já havia re-infestado os países dos quais tinha sido erradicado, atingindo praticamente a mesma distribuição geográfica existente antes ao programa de erradicação.



No Brasil, o reaparecimento do vetor contribuiu para a reintrodução dos DENV na década de 80. Em 1981 e 1982, uma epidemia causada por DENV-1 e -4 ocorreu em Boa Vista (RO), contida por medidas de controle do vetor (OSANAI *et al.*, 1983). E até 1986, nenhum caso de dengue foi reportado, quando ocorreu uma epidemia predominantemente causada pelo DENV-1 (SCHATZMAYR; NOGUEIRA; TRAVASSOS DA ROSA, 1986). O primeiro caso de dengue pelo sorotipo 2 aconteceu em 1990 no Rio de Janeiro, Tocantins e Alagoas (NOGUEIRA *et al.*, 1990) enquanto o de DENV-3 ocorreu em 2001, também no Rio de Janeiro se disseminando posteriormente para outros estados (NOGUEIRA *et al.*, 2001). Em 2002, ocorreu a maior epidemia causada pelo sorotipo 3 do vírus da dengue, com 794.013 casos notificados, sendo 2.707 casos de febre hemorrágica da dengue (FHD), com 150 óbitos (Sistema de informações gerenciais da FUNASA). O DENV-4 não é identificado no Brasil desde 1982 (NOGUEIRA; DE ARAÚJO; SCHATZMAYR, 2007) mas estima-se que há o risco potencial de re-introdução já que este sorotipo circula em países vizinhos, como Venezuela.

Quase todos os países da América Latina têm reportado casos de hiperendemicidade, aumentando o risco de desenvolvimento de formas mais severas da doença. As formas clínicas severas de dengue, febre hemorrágica de dengue (FHD) e síndrome do choque por dengue (SCD) foram inicialmente descritas por volta dos anos 50 e até os anos 70 eram reportados em apenas seis países do sudeste Asiático (GUBLER, 1997). Nas Américas, o início dos casos de FHD/SCD se deu apenas após a epidemia de 1981 em Cuba (KOURI *et al.*, 1989). Atualmente, mais de 60 países diagnosticam casos de FHD e SCD.

## **2.2 Vetor e ciclo de transmissão**

O mosquito *A. aegypti* é o principal vetor do DENV, embora mosquitos da espécie *A. albopictus* também são competentes para transmitir os DENV (EFFLER *et al.*, 2005). O mosquito transmissor está distribuído por todas as regiões tropicais e sub-tropicais do mundo. Além disso, é altamente adaptado ao ambiente doméstico, tem hábito diurno e deposita seus ovos em recipientes contendo água limpa parada (GUBLER, 1998; THOMAS; STRICKMAN; VAUGHN, 2003; MALAVIGE *et al.*, 2004; WEAVER ; BARRET, 2004).

No ciclo de transmissão de DENV, as fêmeas se alimentam do sangue de vários indivíduos em sucessivamente, infectando várias pessoas. No indivíduo, o período de incubação do vírus dura de 4 a 10 dias, causando sintomas não específicos e febre (SILER; HALL; HITCHENS, 1926). Durante o período febril, as partículas virais circulam no sangue periférico, podendo ser transmitidas a mosquitos não infectados. O período de incubação nos mosquitos dura de 8 a 12 dias (GUBLER, 1998; THOMAS *et al.*, 2003). Após esse período, os mosquitos vetores podem transmitir o vírus ao homem, fechando assim o ciclo urbano. Nas florestas tropicais da Ásia e África já foi relatada a ocorrência do ciclo silvestre, no qual o vírus é transmitido entre primatas não-humanos (RODHAIN, 1991; DE SILVA *et al.*, 1999).

### **2.3 Epidemiologia**

Segundo a Organização Mundial de Saúde, três bilhões de pessoas estão em área de risco de infecção e entre 50 e 100 milhões se infectam a cada ano, em cerca de 100 países (Figura 2.1). Dessas, 550 mil pessoas necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da dengue. A dengue é um grave problema de saúde pública principalmente no sudeste da Ásia e nas Américas (GUZMÁN ; KOURI, 2003).

No Brasil, já foram notificadas infecções pelos sorotipos 1, 2 e 3 em todos os estados da federação (Santa Catarina é o único estado que não apresenta casos autóctones). De acordo com dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS), compiladas de janeiro a novembro de 2008, o sorotipo DENV-3, ainda é o mais frequentemente isolado no país (50,7% das amostras isoladas). Porém, houve um aumento na incidência do sorotipo DENV-2 (45,7%) enquanto o sorotipo DENV-1 foi isolado em apenas 3,6% das amostras.

A SVS/MS registrou até novembro de 2008, 787.726 casos suspeitos de dengue, sendo 4.137 casos confirmados de FHD com 223 óbitos. Também foram confirmados 17.477 casos e 225 óbitos de dengue com complicação (DCC), definido como todo caso que não se enquadra satisfatoriamente nos critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS) para FHD ou dengue clássica.



**Figura 2.1** Distribuição geográfica de áreas com risco de transmissão de dengue. As áreas/países em laranja são regiões endêmicas (dados até novembro de 2008). As linhas em marrom demarcam a região em que o vetor *A. aegypti* está presente. Fonte: Adaptado de mapas fornecidos por WHO, 2008

## 2.4 Fatores clínicos da doença

As manifestações clínicas durante a infecção pelos DENV podem variar de assintomática até a febre clássica de dengue (DF), ou ainda evoluir para a febre hemorrágica da dengue (FHD) e síndrome do choque da dengue (SCD) (WHO, 1997).

A DF pode ocorrer em infecções primárias e secundárias e é caracterizada pelo aparecimento súbito de febre, acompanhada por cefaléia, artralgia, mialgia, náuseas, vômitos e exantemas. Já a FHD pode apresentar os mesmos sintomas da DF, podendo evoluir rapidamente para quadros de hemorragias, trombocitopenia e extravasamento de plasma, que são causados especialmente pelo aumento da permeabilidade vascular. O quadro pode se agravar e o paciente entrar em choque hipovolêmico (SCD), aumentando o risco de óbito. Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento das formas graves da dengue ainda não foram totalmente definidos, principalmente pela falta de um modelo animal que reflita as manifestações da FHD/SCD.

Não é possível associar nenhum dos quatro sorotipos à um quadro clínico em particular. De fato, uma maior severidade da doença é observada freqüentemente após uma infecção secundária por um sorotipo viral diferente da infecção primária.

Possivelmente devido à presença de anticorpos não neutralizantes ou sub-neutralizantes, provenientes da primeira infecção que ao invés de neutralizar o novo sorotipo infectante, opsonizam a partícula viral facilitando sua entrada em células-alvo (especialmente monócitos/macrófagos) através do receptor Fc das imunoglobulinas, exacerbando desta forma a infecção. Este fenômeno, denominado *antibody dependent enhancement* (ADE) foi proposto por Halstead ; O'Rourke em 1977.

Outro fator de risco para o desenvolvimento de formas graves da doença é a infecção com cepas virais mais virulentas. Mutações no genoma dos vírus da dengue podem aumentar a virulência das cepas de diferentes formas, como a indução de uma maior competência vetorial, aumento na eficiência de replicação e modulação na resposta imune do hospedeiro à infecção (CLYDE; KYLE; HARRIS, 2006). A co-circulação de vários sorotipos e a introdução de novos genótipos de DENV observada nos últimos anos também está relacionada com o aumento significativo no número de casos de FHD/SCD nas Américas. Considerando a falta de vacinas ou tratamentos específicos contra a dengue, um diagnóstico rápido e eficiente constitui atualmente a melhor maneira de se reduzir à mortalidade induzida pela infecção através do delineamento de ações estratégicas precoces de combate ao mosquito vetor e de suporte aos pacientes.

## **2.5 Prevenção e tratamento**

Não há nenhuma droga antiviral específica disponível para pacientes infectados com dengue, e o tratamento é basicamente de suporte e com reposição de fluídos e eletrólitos. Uma grande variedade de vacinas contra dengue está sendo elaborada e testada, porém há algumas limitações no desenvolvimento de uma vacina eficiente. Uma delas é a necessidade de uma vacina que confira imunidade em longo prazo, e principalmente, que proteja simultaneamente contra os quatro sorotipos da dengue (tetravalente), evitando assim a ocorrência de ADE, que tem sido associado à formas graves da doença. As vacinas em desenvolvimento utilizam principalmente vírus atenuados, pela passagem seriada em culturas de células (KITCHENER *et al.* 2006; EDELMAN *et al.*, 2003), pela introdução de deleções na extremidade 3' NC (WHITEHEAD *et al.*, 2003) ou pela substituição dos genes correspondentes às proteínas prM e E da cepa vacinal de febre amarela 17D pelos

respectivos genes de cada um sorotipos de dengue (GUIRAKHOO *et al.*, 2001). Outras abordagens, como vacinas que utilizam vírus inativados (PUTNAK *et al.*, 2005), subunidades dos vírus (PUTNAK *et al.*, 2005; GUZMAN *et al.*, 2003), vacinas de DNA (RAVIPRAKASH *et al.*, 2003) e vacinas que utilizam vetores de expressão não replicativos (MEN *et al.*, 2000), também estão sendo utilizadas.

## 2.6 Diagnóstico

Um diagnóstico rápido, preciso, e de baixo custo é de extrema importância, principalmente em regiões endêmicas, para a vigilância epidemiológica, para estudos patológicos, clínicos e imunológicos da doença e para manejos clínicos apropriados. Em somatória, a diferenciação da dengue com outras doenças de sintomatologias similares, como leptospirose, rubéola e outras doenças causadas por flavivirus, assim como confirmação de formas mais severas da doença, como FHD e SCD, são necessárias para um diagnóstico eficiente, e consequentemente, tratamento adequado do paciente.

Atualmente, os testes de diagnóstico laboratoriais para dengue podem ser realizados através de isolamento viral, detecção do genoma ou antígeno viral e por sorologia, para detecção de anticorpos específicos (Tabela 2.1). O isolamento viral pode ser realizado a partir do soro, plasma e até mesmo de tecidos com fígado, baço, linfonodos, pulmão e timo (VORDNAM ; KUNO, 1997). O RNA viral pode ser detectado em amostras humanas de sangue e tecido de autópsia, sobrenadantes de cultura celular infectada, ou mosquitos adultos inoculados e larvas de mosquitos (GUBLER, 1998; GUZMÁN ; KOURI, 1996 e 2004). Para detecção de antígenos e anticorpos virais, utiliza-se basicamente o soro (GUZMAN ; KOURI, 2004).

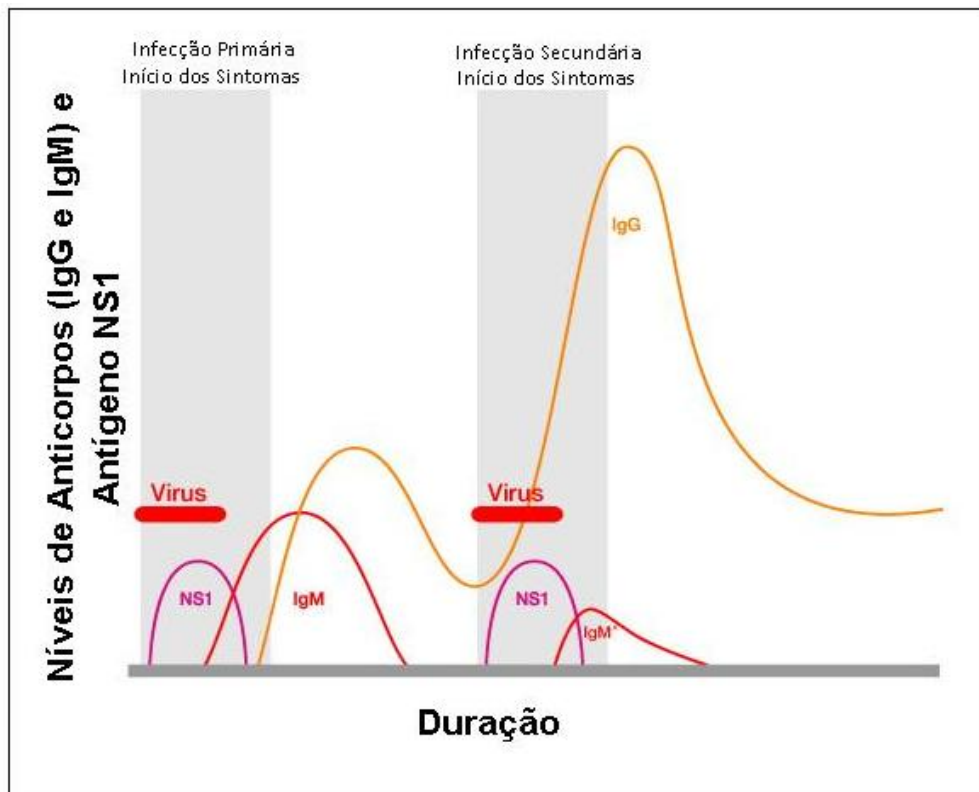
A amostra a ser utilizada bem como a metodologia que deverá ser empregada dependem do estágio da doença e da “janela imunológica” (Figura 2.2). A viremia de dengue é curta, geralmente é observada de dois a três dias antes do aparecimento da febre até quatro a cinco dias depois. Assim, a detecção viral pode ser realizada a partir de amostras recolhidas nos primeiros cinco dias de sintomas da doença (GUZMAN ; KOURI, 2004). Entretanto, a resposta humoral é apresentada em dois padrões distintos, que dependem da condição imunológica do paciente infectado. Na infecção primária, na qual o indivíduo nunca foi exposto ao DENV, geralmente de 3 a 5 dias após o início da febre os pacientes apresentam níveis detectáveis de

anticorpo da classe IgM anti-dengue que persiste de 30 a 60 dias (GUBLER, 1996). Os níveis de anticorpo da classe IgG se elevam depois de 9 a 10 dias e permanecem detectáveis pela vida toda do indivíduo. Em contrapartida, durante a infecção secundária, que ocorre em indivíduos previamente infectados por qualquer um dos quatro sorotipos do DENV, os níveis de IgM se elevam mais tardiamente e alcançam valores mais baixos do que numa infecção primária, enquanto os níveis de anticorpos tipo IgG aumentam 1 a 2 dias após o início da febre e alcançam níveis mais altos do que em infecções primárias (GUBLER, 1996). Portanto, é importante recolher amostras de soro tanto de fases aguda como crônica, para determinação de infecções recentes, assim como diferenciação de infecções primárias e secundárias. Quanto à detecção de antígeno, estudos recentes demonstraram que altas concentrações do antígeno NS1 eram detectadas em soros de pacientes em fase aguda da doença (tanto primária como secundária), até nove dias depois do início dos sintomas (ALCON *et al.*, 2002; KORAKA *et al.*, 2003; YOUNG *et al.*, 2000).

A seguir serão descritas as técnicas e as principais metodologias adotadas rotineiramente pelos laboratórios para diagnóstico da dengue.

**Tabela 2.1 Principais métodos empregados atualmente para diagnóstico da Dengue**

Técnica	Amostra clínica	Deteção	Método
Isolamento viral	Soro, plasma, tecidos como fígado, baço e linfonodos, entre outros	Vírus	Inoculação direta em mosquitos, cultura de células de insetos e mamíferos, inoculação em camundongos
Deteção do genoma	Soro, plasma, tecido	RNA	RT/PCR, qRT-PCR
Sorologia	Soro	IgM e IgG específicos	MAC/ELISA, ELISA, HI, NT
Deteção do antígeno	Soro e tecidos	Proteínas NS1 e E	ELISA, imunohistoquímica



**Figura 2.2.** Esquema demonstrando os níveis de anticorpos específicos anti-dengue IgG (em laranja) e IgM (em rosa), níveis do antígeno NS1 (em roxo) e viremia durante infecções primárias e secundárias (em cinza). FONTE: Adaptado de [www.panbio.com](http://www.panbio.com).

### 2.6.1 Isolamento viral

Atualmente existem três metodologias usadas rotineiramente para o isolamento viral a partir de amostras clínicas: inoculação intra-cerebral em camundongos neonatos, infecção de linhagens de células de mosquito, e inoculação intratorácica em mosquitos adultos (GUBLER, 1998; MONATH, 2001). Qualquer uma destas técnicas permite a direta evidência da presença do vírus ou do RNA viral. No entanto, além de necessitarem de laboratórios especiais, apresentam custo elevado, risco ao manipulador, e períodos mais longos para a emissão dos resultados, além de questões éticas inerentes ao uso de animais de experimentação.

No caso da inoculação intratorácica de mosquitos são utilizadas espécies como *Aedes aegypti* ou *A. albopictus* e a detecção é feita por imunofluorescência indireta (IFI) em tecidos do mosquito, utilizando-se anticorpos sorotipo-específicos (VORNDAM; KUNO, 1997). Apesar de alta sensibilidade, a técnica é muito

trabalhosa, necessita uma quantidade elevada de mosquitos e requer um insetário. Em contrapartida, o uso de linhagens de células de mosquitos em cultura, levou a uma obtenção de resultados rápidos, sensíveis e de baixo custo (GUBLER, 1998). Linhagens como C6/36 (*A. albopictus*), AP-61 (*A. pseudoscutellaris*) e TRA-284 (*Toxorhynchites amboniensis*) foram descritas para isolamento do vírus da dengue (TESH, 1979; RACE; WILLIAMS; AGOSTINI, 1979; VORNDAM; KUNO, 1997). Também são utilizadas células de mamífero como VERO, porém essas apresentam menor eficiência (VORDNAM; KUNO, 1997; GUZMAN ; KOURI, 1996). Por último, a técnica de isolamento viral através de inoculação em camundongos neonatos somente é utilizada quando não há outro método disponível, pois apresenta baixa sensibilidade (GUZMAN ; KOURI, 2004).

A detecção de células infectadas se faz por IFI com anticorpos específicos. Adicionalmente, técnicas como RT-PCR (OLIVEIRA DE PAULA *et al.*, 2003; DEUBEL *et al.*, 1997) e citometria de fluxo (KAO *et al.*, 2005) também foram descritas como alternativas ou integradas à IFI.

### **2.6.2 Detecção do genoma viral**

A técnica de reação em cadeia da polimerase associada à transcrição reversa (RT-PCR) é vantajosa por ser rápida, sensível, simples e possibilitar a detecção e a tipagem dos vírus simultaneamente. Vários protocolos de RT-PCR foram desenvolvidos e o criado por Lanciotti *et al.* (1992), tem sido amplamente usado nas Américas. Estes pesquisadores desenharam oligonucleotídeos consenso para dengue na região dos genes C/prM, que amplificam um produto de 511 pares de bases. Em uma segunda amplificação, oligonucleotídeos específicos para cada sorotipo são utilizados e produtos de diversos tamanhos são amplificados, permitindo determinação do sorotipo infectante.

Outra técnica que vem sendo largamente utilizada é o PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR), que além de detectar, é capaz de quantificar os níveis de RNA viral no soro de pacientes infectados e apresenta menos riscos de contaminação já que é possível associar as reações de RT com às de qPCR (CALLAHAN *et al.*, 2001; SHU *et al.*, 2003; POERSCH *et al.*, 2005). É um processo quase que totalmente automatizado, considerado muito mais confiável e reprodutível



do que as técnicas convencionais de amplificação, e vem contribuindo para que a PCR seja cada vez mais aceita como um método diagnóstico (BUSTIN, 2002).

### 2.6.3 Sorologia

Para o diagnóstico da infecção por dengue, existem diversos testes sorológicos como inibição da hemaglutinação (HI), teste de neutralização por redução de placa (PRNT), fixação do complemento (FC), ensaio imunoenzimático do tipo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA), entre outros. A seguir serão descritos os principais:

Inibição da hemaglutinação: esta técnica, descrita por Clark e Casals em 1958, é um teste simples, sensível e reprodutível, mas pouco utilizado atualmente. A técnica usa como princípio, a capacidade dos anticorpos de inibir a aglutinação de hemácias mediada pelas glicoproteínas virais (VORNDAM; KUNO, 1997). Os soros devem ser testados em diversas diluições e devem ser tratados com acetona ou caulim, para remover inibidores de hemaglutinação, e com hemácias de ganso para eliminar aglutininas não específicas. Além disso, as amostras devem ser pareadas e com um intervalo de no mínimo sete dias, representando uma limitação da técnica. Além disso, não é específico para diferenciar o tipo de Flavivirus, especialmente em pacientes que foram infectados por vários Flavivirus (INNIS *et al.*, 1989).

Fixação de complemento: é o método menos utilizado em diagnóstico, devido a dificuldades técnicas. O teste é baseado na ativação do sistema complemento induzido pelo complexo antígeno-anticorpo. Sua vantagem é que anticorpos que fixam complemento possuem um curto tempo de duração, aparecendo depois dos anticorpos inibidores da hemaglutinação. Ademais, são específicos em infecções primárias, contribuindo para determinação do sorotipo da dengue (VORNDAM; KUNO, 1997).

Teste de neutralização por redução de placa: é específico e sensível, entretanto, demorado, trabalhoso e tecnicamente difícil (GUBLER, 1998). Nesse teste, amostras de soro diluídas são incubadas com quantidades definidas de vírus, posteriormente, as amostras (vírus/soro) são utilizadas para infectar culturas de

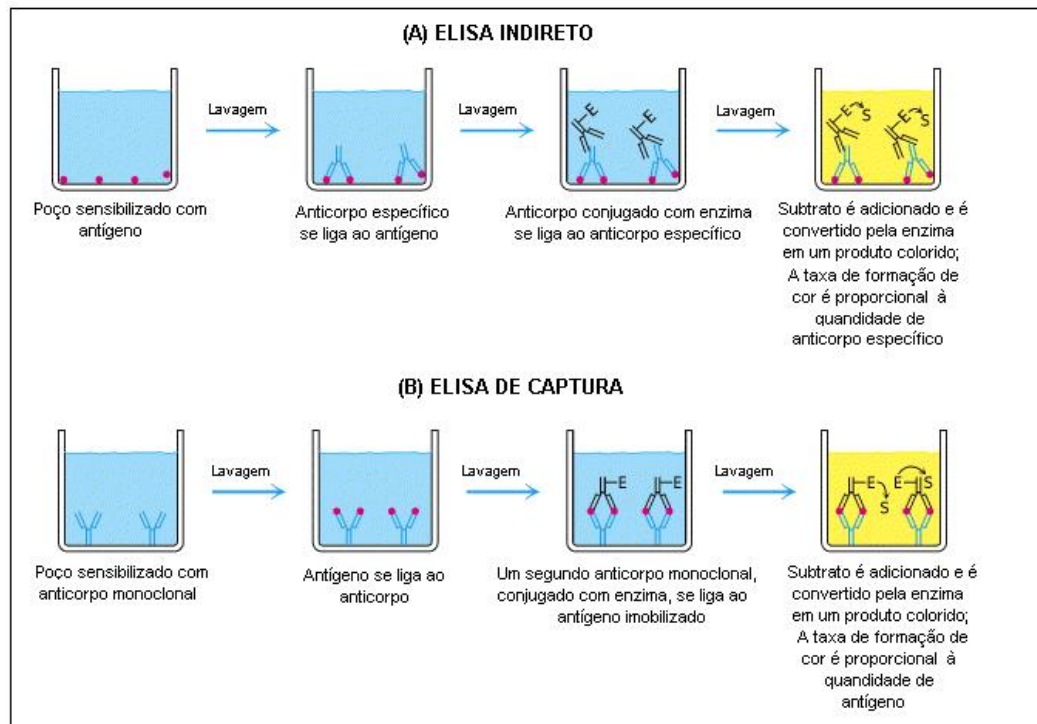
células susceptíveis como VERO e BHK21 (RAO, 1976; MORENS *et al.*, 1985) observando-se a inibição na formação de placas de lise nas culturas.

ELISA: são os testes mais amplamente utilizados para o diagnóstico de dengue, devido a sua alta sensibilidade e facilidade de execução. Testes diagnósticos no formato ELISA são usados para detectar tanto anticorpos específicos anti-dengue durante a fase aguda de doença (IgM, detectados no soro de pacientes no período de três a cinco dias após o aparecimento dos sintomas), como na fase crônica (IgG). Ensaio ELISA também tem sido utilizados para determinar o tipo de infecção, primária ou secundária, através da relação IgM/IgG. Enquanto razões IgM/IgG elevadas, com valores acima de 1,78 indicam infecção primária, valores mais baixos servem de marcadores para infecção secundária (KUNO; GÓMEZ; GUBLER, 1991; MIAGOSTOVICH *et al.*, 1999; SHU ; HUANG, 2004). Quanto à sorotipagem do DENV, Shu *et al.* (2002) desenvolveram um ensaio ELISA alternativo para detecção de anticorpos IgG específicos contra NS1 de cada sorotipo. Apesar de mais difícil, a sorotipagem através de MAC-ELISA foi realizada por Shu *et al.* (2004), obtendo resultados promissores na detecção de anticorpos IgM específicos contra as proteínas M/E e NS1 específicas para cada sorotipo de dengue, em infecções primárias.

Recentemente, outros anticorpos específicos anti-dengue, como IgA e IgE tem sido estudados como ferramentas alternativas em ensaios ELISA. Talarmin *et al.* (1998) identificaram a presença de anticorpos IgM e IgA em pacientes com DF, com alta taxa de especificidade e sensibilidade. Vazquez *et al.* (2005) identificaram níveis mais altos dos anticorpos IgA e IgE em pacientes com infecção secundária, independente da severidade da doença. Por outro lado, Koraka *et al.* (2003) identificaram níveis mais elevados de IgE anti-dengue em pacientes com FHD/SCD do que em pacientes com DF ou não infectados, o que implicaria no uso dessa classe de anticorpos como importante marcador de severidade e prognóstico da doença.

Há uma série de formatos ELISA, mas os mais comuns são ELISA indireto e ELISA de captura (Figura 2.3). No método indireto, os antígenos virais são usados para sensibilização das placas. Em seguida, são incubados com o soro de paciente e posteriormente incubados com imunoglobulina anti-humana conjugada com a enzima peroxidase e, por fim, adiciona-se o cromógeno para revelar a reação que

será lida por espectrofotometria (leitor de ELISA). No formato de captura, conhecido também como MAC-ELISA (*IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay*) e GAC-ELISA (*IgG antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay*), anticorpos anti-humanos IgM (anti-cadeia  $\mu$  da imunoglobulina M) e IgG são fixados em uma placa. Posteriormente, o soro e o antígeno são adicionados. Finalmente, um segundo anticorpo conjugado à uma enzima (peroxidase) é adicionado e a reação, após a adição do cromógeno, é lida por espectrofotometria. Nesse caso, a intensidade da reação é proporcional à quantidade de antígeno presente.



**Figura 2.3.** Esquema da metodologia de (A) ELISA Indireto e (B) ELISA de captura. FONTE: Adaptado e modificado de R. A. Goldsby, T. J. Kindt, B. A. Osborne, *Kuby Immunology*, 4th ed. (W. H. Freeman and Company, 2000), p. 162.

Os antígenos normalmente utilizados nestes testes são partículas virais inativadas provenientes de cultura de células ou extratos de tecidos (CARDOSA *et al.*, 1992; FIGUEIREDO; SIMÕES; CAVALCANTE, 1989), como macerado de cérebro de camundongos infectados (INNIS *et al.*, 1989). Porém, o uso de animais envolve questões éticas, além disso, a utilização da partícula viral completa pode gerar reação cruzada entre os quatro sorotipos do DENV e entre outros flavivirus.

Portanto, as proteínas recombinantes vêm sendo utilizadas como alternativa segura à utilização de partículas virais completas como antígeno (MAKINO *et al.*, 1991; SIMMONS *et al.*, 1998; CUZZUBO *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2001; dos SANTOS *et al.*, 2004). Os primeiros trabalhos utilizaram a proteína recombinante E integral, ou truncada na região hidrofóbica C-terminal (STAROPOLI *et al.*, 1997; DELENDÁ *et al.*, 1994; DELENDÁ; FRENKIEL; DEUBEL, 1994). Porém, os resultados observados não foram satisfatórios para uso em testes diagnósticos, pois houve muita reação inespecífica para diferentes flavivirus. Assim, optou-se pela expressão de domínios imunogênicos da E, como o domínio III (ou B) que foi testado por diferentes grupos (SIMMONS *et al.*, 1998; LUDOLFS *et al.*, 2002; JAISWAL; KHANNA; SWAMINATHAN, 2004; HOLBROOK; SHOPE; BARRETT, 2004), tendo sido reativo principalmente no formato de *immunoblotting*. Dos SANTOS *et al.* (2004) usando outro domínio da proteína E de DENV-2 foram capazes de obter resultados promissores em testes de *Western-blot* e ELISA para detecção de imunoglobulinas da classe G em soro de pacientes. A proteína NS1 também tem sido usada como antígeno isoladamente ou em conjunto com E, em testes formato MAC-ELISA (SHU *et al.*, 2004).

Em 2001, Cuzzubbo *et al.* desenvolveram um kit comercial no formato ELISA para diagnóstico da dengue através da detecção de anticorpos IgM ou IgG específicos (PanBio Dengue Duo, Brisbane, Australia). A inovação deste kit foi a utilização das proteínas recombinantes E de DENV-1, 2, 3 e 4 truncadas e expressas em células S2 de *Drosophila melanogaster* como antígenos, o que permitiu manter as características das proteínas nativas. Os resultados mostraram um elevado nível de especificidade e sensibilidade no diagnóstico de infecções primárias e secundárias com o DENV (CUZZUBBO *et al.*, 2000; HUNSPERGER *et al.*, 2009).

Além do kit comercial da Panbio, há uma gama de kits ELISA comerciais, em diversos formatos, para a detecção de anticorpos contra dengue. Recentemente,

alguns testes comerciais foram avaliados quanto ao seu desempenho na detecção dos níveis de anticorpos IgM anti-dengue no soro de pacientes (sensibilidade), principalmente em infecções secundárias, pois a resposta é geralmente mais fraca e menos específica do que em infecções primárias (GUZMAN ; KOURI, 2004). Em adição, foi determinada a especificidade dos anticorpos contra patógenos que geralmente co-circulam com DENV. Dos nove testes avaliados, cinco eram em formato ELISA e foram providos pelas companhias PanBio Diagnostics (Australia), dois da Omega (Reino Unido), Focus (Estados Unidos) e Standard (Coréia do Sul). Os testes da Panbio, Focus e Standard foram os mais sensíveis quando comparados aos outros e a especificidade mais elevada foi de um ELISA de captura fornecido pela Omega. Porém, os testes da PanBio, Focus e Standard foram os que apresentaram melhor correlação com as referências padrão, ELISAs utilizados pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) e pelo Instituto de Pesquisa de Ciência Médica das Forças Armadas (AFRIMS) (HUNSPERGER *et al.*, 2009).

No Brasil, somente o kit da Panbio é utilizado nos laboratórios de diagnóstico, e por ser importado, o custo de cada reação acaba sendo elevado. Além disso, a hiperendemicidade e a grande quantidade de casos reportados, seja de DF como FHD/SCD, destacam a urgência do desenvolvimento de um kit nacional, sensível e específico.

#### **2.6.4 Detecção do antígeno**

A presença de antígenos virais em soro de pacientes em fase aguda é determinada principalmente por ensaios ELISA, que utilizam enzimas conjugadas com biotina-estraptavidina (KITTIGUL *et al.*, 1997). Através de técnicas de imunohistoquímica, também é possível detectar antígenos em tecidos de biópsia e autópsia, porém estas técnicas não são muito utilizadas para o diagnóstico em países endêmicos (GUZMAN ; KOURI, 2004).

Atualmente, a detecção é principalmente do antígeno NS1, para qual Young *et al.* (2000) padronizaram um ELISA de captura e demonstraram a presença de altos níveis de NS1 no soro de pacientes em fase aguda com infecção secundária. Este resultado também foi observado por Alcon *et al.* (2002). Em adição, Libraty *et al.*, (2002) correlacionaram os níveis de NS1 com os níveis de viremia no plasma e observaram que os níveis do antígeno eram maiores em pacientes com FHD do que

DF. Desta forma, a detecção de antígenos pode representar, além de uma ferramenta diagnóstica, um teste de predição de gravidade de doença, já que a proteína NS1 é secretada no início da infecção, licitando uma resposta imune precoce (XU *et al.*, 2006; ANANDARAO *et al.*, 2006).

Recentemente, dois kits comerciais baseados no formato ELISA foram desenvolvidos para detecção (kit azul) e identificação (kit vermelho) de antígeno, pela empresa americana Globio (Estados Unidos).

### 3. VÍRUS DE FEBRE AMARELA (VFA)

#### 3.1 Histórico

Protótipo da família *Flaviviridae*, o vírus de febre amarela foi o primeiro vírus reconhecido como agente etiológico de uma doença em humanos, e que cuja transmissão se dá através de mosquitos (REED ; CARROLL, 1902). Também foi o primeiro *Flavivirus* a ser cultivado *in vitro* (LLOYD; THEILER; RICCI, 1936).

A descrição mais antiga sobre a febre amarela é de um manuscrito maia, datado de 1648. No entanto, análises da sequência genômica revelaram que o vírus da febre amarela evoluiu de outros vírus transmitidos por mosquitos em torno de 3000 anos atrás (ZANOTTO *et al.*, 1996), provavelmente na África. Nos séculos XVIII e XIX, a febre amarela foi causadora de calamidade em colônias nas Américas e no oeste da África. Porém, após a descoberta do mosquito vetor (REED ; CARROLL, 1902) e o desenvolvimento da vacina (THEILER ; SMITH, 1937), o impacto médico da doença foi reduzido (MONATH, 2001). Nas Américas, devido às campanhas de erradicação do *Aedes aegypti* pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), casos de febre amarela urbana não são reportados desde 1954, a despeito da intensa re-infestação do mosquito (MONATH, 2001). A febre amarela silvestre, por ser uma zoonose, é impossível de ser erradicada.

No Brasil, o primeiro caso de febre amarela urbana aconteceu na Bahia, em 1685, ocorrendo somente outra epidemia em 1849, também na Bahia. No período entre 1850 e 1899 a doença se disseminou pelo país e a última epidemia urbana registrada foi em 1929, no Rio de Janeiro. A febre amarela urbana continuou a ocorrer, de maneira pouco expressiva, até 1942 (FRANCO, 1969).

### 3.2 Vetor e ciclo de transmissão

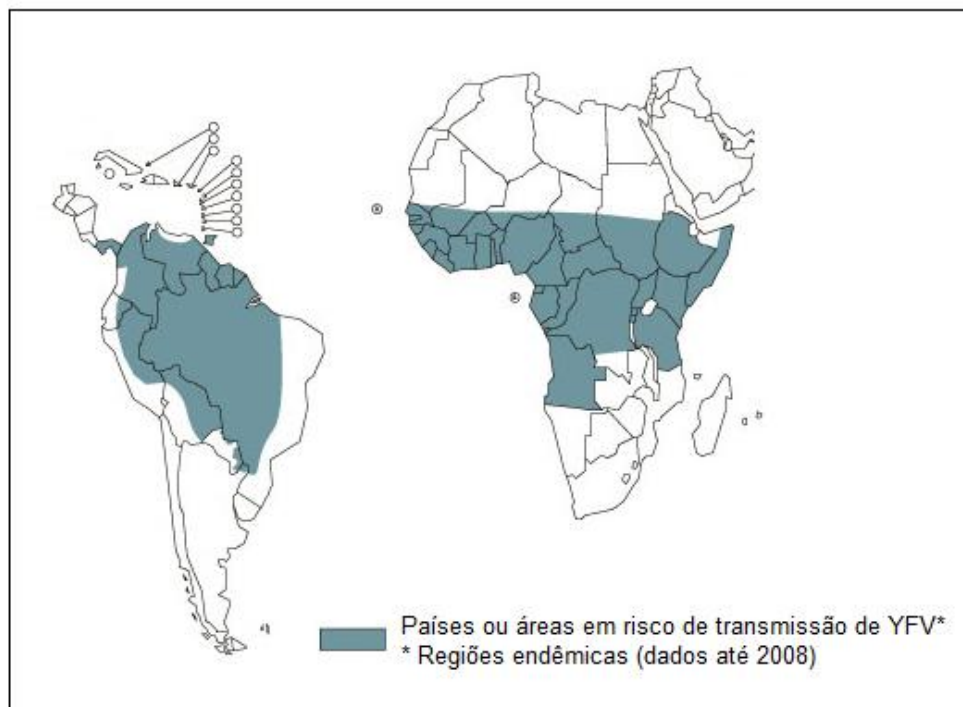
O vírus da febre amarela é mantido em dois ciclos de transmissão, o ciclo urbano e o silvestre. No ciclo silvestre, o vírus é transmitido por mosquitos (*Haemagogus* spp e *Sabethes* spp na América do Sul e *Aedes* spp na África) a primatas não-humanos (MONATH, 2001). Esporadicamente, humanos que têm atividades na natureza são expostos a mosquitos infectados, sendo inserido acidentalmente no ciclo de transmissão e desenvolvendo a febre amarela silvestre. Na África, outro ciclo de transmissão ocorre em regiões de savana úmida, conhecidas como zonas intermediárias de transmissão, e nas quais os mosquitos *Aedes* spp transmitem o vírus de macacos a humanos e entre humanos. Já no ciclo de transmissão urbano, o mosquito peridomiciliar *Aedes aegypti* infectado transmite o vírus entre humanos, que desenvolvem a febre amarela urbana (MONATH, 2001).

### 3.3 Epidemiologia

A febre amarela ocorre nas regiões tropicais da África e da América do Sul (Figura 3.1), sendo a Ásia um potencial alvo para introdução do vírus, já que o vetor, *Aedes aegypti*, está presente (MONATH, 2001). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) a febre amarela atinge 200.000 pessoas por ano no mundo causando cerca de 30.000 mortes. A grande maioria dos casos notificados (90%) ocorre no continente africano, com cerca de 5000 por ano. Em contraste, na América do Sul não é notificado nenhum novo caso de febre amarela urbana desde 1954, devido à erradicação do vetor urbano *Aedes aegypti* nos países sul-americanos mais afligidos pela febre amarela (Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Paraguai, Peru, Venezuela e Argentina) e à ampla cobertura vacinal nas áreas endêmicas (VASCONCELOS, 2003).

No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, no período de 1989 a 2008, ocorreram 540 casos com 236 óbitos. Os casos ocorreram em áreas consideradas de risco de transmissão, que compreendem as regiões Norte, e Centro-oeste, o estado do Maranhão e as partes ocidentais do Piauí, Bahia, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A febre amarela acomete geralmente agricultores, madeireiros, pescadores e ecoturistas e apesar do número limitado de casos notificados, a letalidade pode chegar a 50%. De janeiro a junho de 2008, a

situação epidemiológica era de quarenta e cinco casos confirmados, dos quais vinte e cinco evoluíram para óbito (Taxa de letalidade de 55,6%). Recentemente, os estados de SP e RS reportaram casos de febre amarela silvestre. No período de novembro de 2008 a março de 2009 foram confirmados oito casos (com 5 óbitos) no RS enquanto em SP, no período de março a abril de 2009, foram confirmados 22 casos, com 9 óbitos (taxa de letalidade 40,9%).



**Figura 3.1** Distribuição geográfica de áreas com risco de transmissão de febre amarela. As áreas/países em cinza são regiões endêmicas para febre amarela (dados até 2008). Fonte: Adaptado de mapas fornecidos por WHO, 2008.

### 3.4 Fatores clínicos da doença

No curso da infecção do vírus da febre amarela, o período de incubação médio do vírus no indivíduo é de 3 a 6 dias e os sintomas clínicos são variados, podendo ocorrer sob formas oligossintomáticas até fulminantes, na qual sintomas clássicos como icterícia, albuminúria e hemorragia estão presentes (VASCONCELOS, 2003).

A forma clássica da doença é caracterizada por apresentar um quadro clínico bifásico, nas quais as duas fases são separadas por um curto período de remissão (MONATH, 2001). A primeira fase da doença é chamada “período de infecção” e



corresponde ao período de viremia e às formas mais leves e moderadas da doença. Nessa fase, o quadro clínico é inespecífico, podendo ser confundida com outras doenças infecciosas co-circulantes e tornando difícil o diagnóstico. Nas formas leves observa-se febre de início súbito, acompanhada ou não de cefaléia, astenia, e tontura. Esse quadro tem duração rápida, de algumas horas até dois dias, com recuperação sem seqüelas (VASCONCELOS, 2003). Nas formas moderadas sintomas como febre, cefaléia, mialgia generalizada, artralgia, náusea, vômitos, calafrios estão presentes. Pode haver eritema conjutival e facial além de bradicardia associada à febre (sinal de Faget), indicando envolvimento cardíaco. Esse período dura em média de 3 a 6 dias seguido por um período de remissão, no qual a febre e os sintomas desaparecem. Este período dura em torno de 24 horas, com a recuperação total do paciente, ou, em 15-25% das pessoas afetadas, a doença reaparece de forma mais severa (MONATH, 2001). Nesta fase (“período de intoxicação”) o vírus deixa a circulação sanguínea e atinge órgãos como fígado, baço e linfonodos (VASCONCELOS, 2003). Caracteriza-se pelo aparecimento de sintomas como febre alta, icterícia, insuficiência renal e hemorragias. Aproximadamente 20 a 50% dos pacientes com doença hepato/renal morrem, geralmente entre 7 -10 dias de doença. (MONATH, 2001)

### **3.5 Prevenção e tratamento**

Nas áreas de transmissão, a prevenção da febre amarela é através do controle químico e biológico do vetor e da vacinação. A vacina 17D foi obtida através de passagens seriadas da cepa Asibi (cepa virulenta isolada de um paciente na África no ano de 1927 por Stokes, Bauer e Hudson, 1928), em cérebros de camundongos e células embrionárias de galinha (THEILER ; SMITH, 1937). É considerada uma das vacinas de vírus atenuado de maior sucesso, por ser altamente eficiente, duradoura e bem tolerada. Nos 60 anos de uso, aproximadamente 400 milhões de pessoas foram imunizadas e relatos de reações adversas severas são raros. A produção das cepas vacinais ocorrem em 8 países, entre eles o Brasil (cepa 17DD). A cobertura vacinal é alta em regiões da América do Sul (80-90%) quando comparada à muitos países da África (1-40%) (MONATH, 2001).

Apesar da eficácia da vacina, a probabilidade de ocorrer um surto em grandes proporções é alta, devido ao aumento na incidência da doença nos últimos 25 anos

e ao risco da ocorrência de febre amarela urbana na África e América do Sul (BARRETT ; HIGGS, 2007). Assim, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de drogas antivirais específicas para um tratamento eficiente. Atualmente, não há nenhuma droga antiviral específica disponível contra infecções por flavivirus.

Algumas proteínas virais são alvos potenciais de estudo para desenvolvimento de drogas antivirais contra flavivirus que possam bloquear a replicação viral ou modular as respostas do hospedeiro para prevenir ou tratar a doença (BRAY, 2008). Um exemplo de alvo terapêutico para a inibição de estágios da morfogênese viral é a protease viral, altamente conservada entre os flavivirus, e que está envolvida no processamento da poliproteína e conseqüentemente, na montagem do complexo de replicação viral. Leung *et al.* (2001) mostraram que a expressão da serina protease recombinante do vírus da febre amarela contendo um peptídeo de ligação (*linker*) composto de quatro resíduos de glicina, um de serina e mais quatro de glicina (Gly4-Ser-Gly4) entre o co-fator (a região hidrófila de NS2B), e o domínio do protease NS3 (NS3<sub>pro</sub>) poderia ser produzida no sistema de *Escherichia coli*. A protease obtida com esta estratégia apresentou atividade. Para se excluir eventuais contaminantes da bactéria na atividade proteolítica, os autores realizaram experimentos de mutagênese dirigida e comprovaram que a putativa substituição da tríade catalítica suprime a atividade da protease *in vitro* e que, quando estas mudanças são incorporadas a um cDNA completo e infeccioso, o vírus não é recuperado (CHAMBERS *et al.*, 1990b). Utilizando esta mesma abordagem, vários grupos de pesquisa relataram a reação específica ao substrato, parâmetros cinéticos, e os perfis de inibidores das proteases de DENV, WNV e VFA (LI *et al.*, 2005; GANESH *et al.*, 2005; GOUVEA *et al.*, 2007; SHIRYAEV *et al.*, 2006; YIN *et al.*, 2005 a,b; LOHR *et al.*, 2007; YUSOF *et al.*, 2000; VALLE ; FALGOUT , 1998).

### 3.6 Diagnóstico

Um dos fatores agravantes do diagnóstico dessa doença é a evolução rápida para formas mais graves e a similaridade de sua sintomatologia com a de outras doenças febris como malária, sarampo e leptospirose. Neste contexto, testes diagnósticos rápidos, sensíveis, eficientes e de baixo custo são de extrema importância para que seja determinado o agente etiológico, principalmente nas áreas onde Flavivirus co-circulam.

Os testes laboratoriais são praticamente os mesmos adotados para o diagnóstico da dengue, no entanto, para febre amarela, não há nenhum teste comercial disponível (MONATH, 2001). Para isolamento viral também são utilizados os sistemas de inoculação intracerebral de camundongos neonatos, inoculação intratorácica de mosquitos e culturas de células. A detecção da partícula viral é realizada através de técnicas como IFI, porém, para detecção do genoma viral, a técnica preferencial é a de RT-PCR, principalmente com amostras clínicas em que os resultados foram negativos através do isolamento viral (DEUBEL *et al.*, 1997).

Ensaio ELISA, para detecção do antígeno viral no soro, permitiram um diagnóstico mais rápido e precoce e, quando comparado com isolamento viral em células AP61, demonstraram 69% de sensibilidade e 100% de especificidade (SALUZZO *et al.*, 1985). Anticorpos IgM específicos contra a febre amarela, são detectáveis a partir do quinto dia de sintomas e podem persistir até 90 dias. Assim, ensaios MAC-ELISA, podem indicar uma infecção recente (2-3 meses) ou corrente (atual) (VASCONCELOS, 2003). Vale ressaltar que a vacina também induz a formação de anticorpos IgM. Outros testes, como inibição da hemaglutinação, fixação de complemento e teste de neutralização por redução em placa, também são utilizados como métodos sorológicos (VASCONCELOS, 2003).

#### **4. SISTEMAS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE DENV E VFA**

A tecnologia da expressão de proteínas recombinantes vem sendo utilizada com diferentes propósitos, desde funcionais, bioquímicos e até terapêuticos. Proteínas ou domínios de proteínas recombinantes de *Flavivirus* têm sido expressos usando diversas abordagens com a finalidade de uso em diagnóstico e desenvolvimento de vacinas (revisado por CHAMBERS ; MONATH, 2003). Quanto aos sistemas utilizados para expressão de proteínas de flavivirus, já foram relatados trabalhos utilizando tanto sistemas procarióticos como eucarióticos, principalmente para caracterizações conformacionais, estudo das propriedades imunogênicas e funcionais, como para uso no desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico (NOISAKRAN *et al.*, 2007; BERA; KUHN; SMITH, 2007; MODIS *et al.*, 2004;

KUMMERER ; RICE, 2002; CUZZUBO *et al.*, 2001; DELENDÁ *et al.*, 1994; DELENDÁ; FRENKIEL; DEUBEL, 1994; FEIGHNY; BURROUS; PUTNAK, 1994; MASON *et al.*, 1991).

A expressão de proteínas recombinantes no sistema de bactérias apresenta a vantagem de ser rápida e possibilitar a obtenção de proteínas em larga escala. Porém, grande parte das proteínas expressas fica contida na fração insolúvel da preparação, e devem ser purificadas em condições desnaturantes, alterando assim sua estrutura e consequentemente função e/ou antigenicidade. Além disso, o sistema não inclui modificações pós-traducionais, como por exemplo, a glicosilação de proteínas. Entretanto, a expressão da protease viral recombinante em *E.coli*, foi de grande êxito, pois a proteína manteve sua conformação nativa e sua atividade enzimática, como descrito no tópico 3.5.

Para proteínas que apresentam um padrão de glicosilação, como NS1 e E, são necessários sistemas alternativos. Assim, destacou-se o uso de células eucarióticas, como leveduras, células de mamíferos e de insetos para a expressão, pois permitem o processamento pós-traducional das proteínas recombinantes. Entretanto estes sistemas podem apresentar algumas desvantagens. Por exemplo, a manutenção de células de levedura e de células de mamíferos pode ser muito demorada e trabalhosa, além de cara, ao contrário das células de insetos. Outra vantagem do uso de células de insetos é de que também desempenham modificações pós-traducionais, como N- e O-glicosilação, pelo menos em algum nível (KIDD ; EMERY, 1993). O sistema de baculovírus para expressão em células de inseto, apesar de frequentemente empregado, apresenta uma manutenção que pode ser muito demorada e trabalhosa, em função do crescimento de estoques virais. Outro fator, é que por ser um sistema lítico, as proteínas desejadas podem ser degradadas.

A metodologia para a expressão de proteínas heterólogas em células de *Drosophila melanogaster*, linhagem Schneider 2 (S2) (SCHNEIDER, 1972), apresenta muitas vantagens. As células S2 podem crescer em altas densidades sem necessitar de CO<sub>2</sub> (ao contrário das células de mamífero), produzem proteínas com modificações pós-tradicionais, e através de co-transfecções com plasmídeos que conferem resistência à antibióticos, é possível selecionar linhagens celulares que expressem estavelmente o gene de interesse. Outro fator importante é a existência de diferentes vetores que possuem promotores com indução controlada além da constitutiva, sinais de secreção e *tags*, além de permitirem diferentes estratégias de

clonagem (como o sistema *Gateway™*). Os vetores com o promotor de metalotioneína (MT) (BUNCH; GRINBLAT; GOLDSTEIN, 1988), permitem controlar a produção da proteína recombinante, através da expressão induzida pela adição de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) ao meio. Além disso, os vetores também podem conter o sinal de seqüência de secreção BiP (*immunoglobulin-binding protein*) (KIRKPATRICK *et al.*, 1995), que permite a secreção da proteína recombinante no meio extracelular, facilitando posteriores procedimentos de purificação e concentração das proteínas expressas.

## 5. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A dengue é, atualmente, uma das principais doenças causadas por arbovírus, atingindo milhões de pessoas em todo mundo. Não há nenhuma vacina, devido às limitações para seu desenvolvimento, como a inexistência de modelos animais capazes de reproduzir as formas graves de dengue e a necessidade de uma vacina tetravalente que proteja contra os quatro sorotipos simultaneamente. Também não há nenhuma droga antiviral específica contra dengue. Como os sintomas iniciais da dengue podem ser confundidos com uma série de outras infecções comuns que co-circulam na mesma área, e a rápida evolução para as formas graves da doença, é fundamental que se tenha disponível um teste diagnóstico rápido, inequívoco e de baixo custo, para o manejo dos indivíduos infectados e medidas de controle do mosquito vetor. Os kits diagnósticos hoje utilizados no Brasil, e adquiridos através do Ministério da Saúde são importados e embora apresentem resultados satisfatórios, são de alto custo. A produção de proteínas recombinantes de cepas de vírus da dengue que circulem no país e a avaliação destes insumos para o desenvolvimento de kits de diagnósticos rápidos, precisos e de custo exequível a realidade do país seria uma alternativa factível.

No caso da febre amarela, apesar da existência de uma vacina altamente eficaz, a prevenção e campanhas se restringem às áreas endêmicas, aumentando a vulnerabilidade da população no caso de uma epidemia. Além disso, a taxa de letalidade é muito alta e também não há nenhuma droga antiviral específica, somente tratamento de suporte, como descrito anteriormente. Além disso, por apresentar um modelo animal (primata não-humano) que reflete as formas clínicas observadas em indivíduos infectados, o vírus da febre amarela constitui um excelente modelo de estudo para ser estendido a outros flavivirus. Assim, o estudo da funcionalidade da protease viral do vírus da febre amarela e potenciais inibidores poderia ajudar no desenvolvimento de drogas terapêuticas, impedindo a replicação do vírus.

Baseado nestas premissas, os objetivos principais deste trabalho foram:

- Clonar e caracterizar clones referentes as proteínas recombinantes de envelope (E), a químera pré-membrana e envelope (prM/E) e a não-estrutural 1 (NS1), dos quatro sorotipos do DENV (DENV-1 -2, -3 e -4) utilizando o sistema de expressão em linhagens de células S2 de *Drosophila*, através da implantação e padronização do mesmo;

- Padronizar a utilização destas proteínas no desenvolvimento de kits de diagnóstico sorológico de dengue no formato ELISA, para detecção de anticorpos IgM e IgG em amostras de soro de pacientes;

- Paralelamente, clonar, caracterizar e produzir a protease recombinante funcional do vírus da febre amarela, assim como o controle da protease mutada no sítio ativo, em sistema de *E. coli* para ensaios de atividade em substratos sintéticos (em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Juliano, da Escola Paulista de Medicina).

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Materiais

#### 6.1.1 Soluções e Tampões

- 1X PBS: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;
- 1X PBS/ 0.01% Tween (Tampão Lavagem para ELISA): 1X PBS com 0.01% Tween-20;
- 1X PBS/ 0.01% Tween/ 2% leite (Tampão ELISA): 1X PBS com 0.01% Tween-20 e 2% de leite em pó desnatado;
- 1X PBS/ 0.05% Tween (Tampão Lavagem para Citometria de fluxo): 1X PBS suplementado com 0.05% Tween-20;
- 1X TBE: 89mM Tris-base, 89mM Ácido Bórico, 2mM EDTA (pH 8);
- 1x TBS: 100mM Tris-HCl, 500mM NaCl (pH 8);
- 1x TBS/5% leite: 100mM Tris-HCl (pH 8), 500mM NaCl, 5% leite em pó desnatado;
- 2.5mM dNTPs: 2.5mM de cada desoxiribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 2X HBS: 50mM HEPES, 1.5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 280mM NaCl (pH 7.1);
- Azul de Comassie (Para coloração irreversível de proteínas em gel de acrilamida): 0.1% Azul de Comassie R-250, 45% Metanol, 10% Ácido acético;
- Solução de Descoloração de géis corados com azul de Comassie (lenta): 4% Metanol, 7.5% Ácido Acético
- Solução de Diálise proteínas expressas em *Drosophila*: 50mM Tris, 300mM HCl (pH 7.5)
- Solução de eletroforese SDS-PAGE 1x : 25mM Tris-base, 192mM Glicina, 0,1% SDS 10%
- Solução de Ponceau S 1%: 0.5% Ponceau S, 1% Ácido acético
- Solução Transferência de *Western-blot*: 25mM Tris-base, 192mM Glicina, 20% Metanol
- Tampão de amostra para DNA 10x: 25% Ficoll (tipo 400), 0,25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol FF



- Tampão de amostra para géis de proteínas 4X : 40mM Tris-HCl 1M pH 6.8, 1% SDS 10%, 2.5%  $\beta$ -mercaptoetanol, 6% Glicerol, 0.005% Azul de Bromofenol
- Tampão de Lise para células de *Drosophila*: 50mM Tris-base, 150mM NaCl, 1% NP-40 (pH 7,8);
- Tampão de Lise para técnica de palitagem: 5mM NaOH, 5% Glicerol, 0.5% SDS, 5mM EDTA e uma pitada de azul de bromofenol;
- Tampão de Lise/Sonicação bactérias *E.coli*: 50mM HEPES, 300mM NaCl, 5% Glicerol (pH7.5)
- Tampão Eluição de proteínas expressas em *Drosophila*: 50mM TrisHCl, 300mM NaCl, 500mM Imidazol (pH 7.5)
- Tampão Eluição de proteínas expressas em *E.coli*: 50mM HEPES, 300mM NaCl, 500mM Imidazol (pH7.5)
- Tampão Fosfatase Alcalina (AP-buffer): 100mM Tris-HCl pH 9,5 1M, 100mM NaCl, 5mM  $MgCl_2$
- Tampão Lavagem de proteínas expressas em *Drosophila*: 50mM TrisHCl, 300mM NaCl, 10mM Imidazol (pH 7.5)
- Tampão Lavagem de proteínas expressas em *E.coli*: 50mM HEPES, 300mM NaCl (pH7.5)
- Tampão Permeabilização (para Citometria de Fluxo): solução 1:1 de *FACS Lysing Solution* 10%/paraformaldeído 4%

### 6.1.2 Meios de Cultura

#### - Bacterianos

- Meio SOC: 2% Bactotripton, 0,5% Extrato de Levedura, 10mM NaCl 2.5mM KCl, 10mM  $MgCl_2$ , 10mM  $MgSO_4$ , 20mM Glicose
- Meio LB 1X (Meio de cultura “Luria Broth” para *E.coli*): 10g/L Bactotripton, 5g/L Extrato de Levedura , 5g/L NaCl
  - Meio LB/Ampicilina: Meio LB 1X suplementado com 100 $\mu$ g/mL de ampicilina
  - Meio LB/Ampicilina/Kanamicina: Meio LB 1X suplementado com 100 $\mu$ g/mL de ampicilina e 25 $\mu$ g/mL de kanamicina

- Meio LB sólido: 10g/L Bactotripton, 5g/L Extrato de Levedura, 5g/L NaCl, 15g/L ágar
  - Meio LB sólido/Ampicilina: Meio LB 1X sólido suplementado com 50µg/mL de ampicilina
  - Meio LB sólido/Ampicilina/Kanamicina: Meio LB 1X sólido suplementado com 100µg/mL de ampicilina e 25µg/mL de kanamicina
- Meio NZY<sup>++</sup>: 10g/L NZ amina (caseína hidrolisada), 5g/L Extrato de Levedura, 5g/L NaCl suplementados com 12.5mL/L 1M MgCl<sub>2</sub>, 12.5mL/L 1M MgSO<sub>4</sub>, 10mL/L 2M Glicose

- Células de inseto

- Schneider's *Drosophila* Medium (Invitrogen): Fórmula não fornecida pelo fabricante, suplementado com 10% de SFB e 50.000 U/L de Penicilina-Estreptomicina

### 6.1.3 Linhagens Bacterianas de *E.coli*

TOP 10F' (Invitrogen): F' {*lacI*<sup>q</sup> Tn10 (Tet<sup>R</sup>)} *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80/*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1'* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*

TOP10 (Invitrogen): F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80/*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1* *nupG*

M15 (QIAGEN): NaI<sup>S</sup>, Str<sup>S</sup>, Rif<sup>S</sup>, Thi<sup>-</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>+</sup>, Gal<sup>+</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup>.

XL1-Blue (Stratagene): *endA1* *gyrA96*(nal<sup>R</sup>) *thi-1* *recA1* *relA1* *lac* *glnV44* F'[::Tn10] *proAB*<sup>+</sup> *lacI*<sup>q</sup> Δ(*lacZ*)M15] *hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)

### 6.1.4 Linhagens Celulares

Células de *Drosophila* linhagem S2 (Invitrogen): Derivada de cultura primária de embriões de *Drosophila melanogaster* em estágio tardio (20-24 horas de idade) (SCHNEIDER, 1972).

### 6.1.5 Cepas Virais

DENV 1 BR/01-MR (isolada e caracterizada no laboratório de Virologia Molecular do ICC, número de acesso GenBank AF513110)

DENV 2 Jamaica/N.1409 (número de acesso GenBank M20558)

DENV 3 BR/ 290-02 (isolada e caracterizada no laboratório de Virologia Molecular do ICC, número de acesso GenBank EF629369)

DENV 4 ThD4\_0087\_77 (número de acesso GenBank AY618991)\*

VFA 17DD (cepa vacinal) (número de acesso GenBank YFU17066)

\* Fragmento da proteína E obtido por PCR (produzido por Duarte dos Santos CN, no Instituto Pasteur, Paris), com 99% de identidade com a cepa viral descrita.

### 6.1.6 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos iniciadores estão representados nas tabelas 6.1 e 6.4. O símbolo (+) identifica oligonucleotídeos positivos, complementares à fita de DNA de orientação 3'-5' do gene de interesse. O símbolo (-) identifica oligonucleotídeos negativos, complementares e reversos à fita de DNA de orientação 5'-3' do gene de interesse. Os oligonucleotídeos utilizados para seqüenciamento estão representados nas tabelas 6.3 e 6.4.

### 6.1.7 Plasmídeos

pQE-30 (QIAGEN)

pMT/BiP/V5-His A (Invitrogen)

pMT/BiP/V5-His GFP (Invitrogen)

pMT/V5-His TOPO (Invitrogen)

pMT/V5-His A (Invitrogen)

pCOBlast (Invitrogen)

### 6.1.8 Anticorpos

- Anti-VFA: Anticorpo policlonal produzido no laboratório de Virologia Molecular do ICC, contra o VFA
- Anti-DENV1: Anticorpo policlonal produzido em camundongos contra o DENV-1 \*
- Anti-DENV2: Anticorpo policlonal produzido em camundongos contra o DENV-2 \*
- Anti-DENV3: Anticorpo policlonal produzido em camundongos contra o DENV-3 \*
- Anti-DENV4: Anticorpo policlonal produzido em camundongos contra o DENV-4 \*
- Anti-His (Amersham): Anticorpo monoclonal contra 6xHis
- Anti-humano IgG (cadeia  $\gamma$ )HRP (Sigma): Anticorpo para ensaios ELISA
- Anti-humano IgG (H+L) AP (Promega): Anticorpo para ensaios de *Western-blot*
- Anti-camundongo IgG PE (E-bioscience): Anticorpo para ensaios de Citometria de fluxo.
- Anti-camundongo IgG (H+L) AP (Promega): Anticorpo para ensaios de *Western-blot*
- Anti- camundongo IgG HRP Peroxidase (Sigma): Anticorpo para ensaios ELISA
- Anti-humano IgM (cadeia  $\mu$ ) AP (Sigma): Anticorpo para ensaios de Western-blot
- Anti-humano IgM (cadeia  $\mu$ ) HRP (Sigma): Anticorpo para ensaios ELISA
- Anti-V5 (Invitrogen): Anticorpo monoclonal contra o epítipo *Gly-Lys-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr*.

\* Cedidos por Philippe Desprès, Instituto Pasteur, Paris

## 6.2 Metodologias para expressão de proteínas recombinantes de DENV no sistema de *Drosophila*

### 6.2.1 Reação da Transcriptase Reversa (RT)

O RNA viral de DENV (sorotipos 1, 2 e 3) foram convertidos a uma cópia complementar de DNA (cDNA), através de amplificação enzimática utilizando-se o kit *Improm II Reverse Transcriptase* (Promega) e o oligonucleotídeos iniciadores randômicos (*Random Primer*, Invitrogen), que se hibridizam à sequências aleatórias de RNA ou DNA, gerando fragmentos de diversos tamanhos. Iniciou-se a reação misturando 2,5  $\mu$ L de RNA viral com 2,5  $\mu$ L de *Random Primer* (100 pmol/ $\mu$ L) e

incubando a mistura a 70 °C por 5 min em um termociclador (Eppendorf). Em seguida, foram adicionados 4 µL do tampão comercial de reação (5X), 2,4 µL de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 4 µL de uma solução de 2,5 mM de dNTPs (Pharmacia), 0,5 µL de RNase OUT (40U/ µL, Invitrogen), 1 µL de Improm II (5U/ µL, Promega) e água ultra-pura tratada com DEPC, para um volume final de 20 µL. Esta reação foi incubada a 42 °C, por 1 hora.

### 6.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para DENV

Os genes correspondentes às proteínas prM/EΔ<sub>100</sub> (proteína prM juntamente com o ectodomínio da proteína E, que equivale a deleção dos 100 últimos aminoácidos da mesma), à proteína EΔ<sub>100</sub>, assim como à proteína NS1, de DENV-1,-2 e -3, foram amplificados por reações de PCR a partir do cDNA sintetizado e descrito anteriormente e de oligonucleotídeos específicos (itens 1 ao 15 da tabela 6.1), com auxílio do kit (Eppendorf). Em contrapartida, o PCR correspondente ao ectodomínio da proteína E de DENV-4 foi realizado a partir de outro produto de PCR, identificado como pD4/EΔ<sub>100</sub> (Duarte dos Santos CN, dados não publicados). Este novo PCR também foi realizado com uso de oligonucleotídeos específicos (itens 21 e 22 da tabela 6.1) e do kit *TripleMaster PCR System*. A reação de PCR consistiu de 5 µL das amostras de cDNA (No caso de DENV-4, foram 0,5 µL do produto de PCR), 2,7 µL de uma solução de 2,5mM de dNTPs, 2 µL de tampão comercial de reação (10X *High Fidelity Buffer with Mg<sup>2+</sup>*), 2 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (5pmol/µL), 0,3 µL da enzima Triple Master (5U/ µL ) e água ultra-pura tratada com DEPC para volume final de 20 µl. Esta reação foi submetida a 1 ciclo de desnaturação do DNA a 94°C por 3 min e a 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, de hibridação dos oligonucleotídeos a 55 °C por 30 seg e extensão da cadeia de DNA a 68°C por 3 min. Alíquotas das amostras de DNA amplificadas (1:10) foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Os amplicons correspondentes às regiões genômicas determinadas foram purificados utilizando-se o kit *High Pure PCR* (Roche) de acordo com o protocolo do fabricante e recuperados em 50 µL de água ultra-pura. Os amplicons gerados estão representados na tabela 6.2.

Visando um melhor rendimento na expressão de proteínas de DENV-3, foram utilizadas estratégias de clonagem adicionais, que serão discutidas detalhadamente no tópico 6.2.3. Através do desenho de outros oligonucleotídeos (itens 16 a 20 da tabela 6.1), também foi possível a clonagem de fragmentos de DNA correspondentes as proteínas E $\Delta_{100}$  e NS1 em outros vetores (itens realçados da tabela 6.2). A reação de PCR para amplificação destas regiões ocorreu semelhantemente ao protocolo de amplificação previamente citado, com exceção da hibridação dos nucleotídeos, que foi a 52 °C por 30 seg. Alíquotas destas amostras de DNA também foram analisadas em gel de agarose e purificadas através do kit *High Pure PCR* (Roche), utilizado de acordo com o protocolo do fabricante e recuperados em 50  $\mu$ L de água ultra-pura. Os amplicons gerados estão representados na tabela 6.2.

**Tabela 6.1. Oligonucleotídeos iniciadores específicos para as proteínas para prM e Envelope, Envelope e NS1 dos sorotipos 1, 2, 3 e 4 do vírus da dengue**

OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUENCIA	REGIAO GENOMICA*	ENDONUCLEASE DE RESTRIÇÃO
1. DENV1prME +	5' GAAGATCTTCCCATTTGACCACACGAGGGGGAGAG 3'	437-463	Bgl II
2. DENV1 E +	5' GAAGATCTATCGATGCGTGGGAATAGGC 3'	935-955	Bgl II
3. DENV1 E Δ <sub>100</sub> -	5' GGCCTCGAGGCTGCTTCCTTCTTGAACCAGCT 3'	2102-2125	Xho I
4. DENV1 NS1 +	5' GAAGATCTGACTCGGGATGTGTAATCAACTGG 3'	2420-2443	Bgl II
5. DENV1 NS1 -	5' CGTCTAGATGCAGAGACCAATTGACCTAAC 3'	3455-3475	Xba I
6. DENV2 prME +	5' TCCCCCGGGTTCCATTTAACCACACGTAATGGAGGACCA 3'	439-468	Sma I
7. DENV2 E +	5' GAAGATCTATGCGTTGCATAGGAATATCAAT 3'	937-960	Bgl II
8. DENV2 E Δ <sub>100</sub> -	5' CGTCTAGAGGAACCTTCCTTCTTAAACCAGTTGAG 3'	2101-2127	Xba I
9. DENV2 NS1 +	5' GAAGATCTGATAGTGGTTGCGTTGTGAGCTGG 3'	2422-2445	Bgl II
10. DENV2 NS1 -	5' CGTCTAGAGGCTGTGACCAAGGAGTTGAC 3'	3457—3477	Xba I
11. DENV3 prME +	5' GAAGATCTTCCACTTGACTTCACGAGATGGAGAG 3'	437-463	Bgl II
12. DENV3 E +	5' GAAGATCTATGAGATGTGTGGGAGTAGGA 3'	935-955	Bgl II
13. DENV3 E Δ <sub>100</sub> -	5' CGTCTAGAAGAGCTTCCTTCTTATACCAGTT 3'	2096-2119	Xba I
14. DENV3 NS1 +	5' GAAGATCTGACATGGGATGTGTTATAAACTGG 3'	2414-2437	Bgl II
15. DENV3 NS1 -	5' CGTCTAGACGCTGAGACTAAAGACTTTAC 3'	3449-3469	Xba I
16. DENV3 SE +	5' GACTAGTCAACATGAGATGTGTGGGAGTAGGAAAC 3'	935-958	Spe I
17. DENV3 X E Δ <sub>100</sub> -	5' AATCTAGATTATCAATGGTGATGGTGATGATGAGAGCTTCCTTCTTATACCAGTTG3'	2096-2120	Xba I
18. DENV3 S IsNS1 +	5' GACTAGTCAACATGTTGAATTCAAAAACACATCCATGTCA 3'	2330-2356	Spe I
19. DENV3 S ssNS1 +	5' GACTAGTCAACATGTCAATTTTCATGCATTGCAATAGGA 3'	2351-2377	Spe I
20. DENV3 X NS1 -	5' AATCTAGATTATCAATGGTGATGGTGATGATGCGCTGAGACTAAAGACTTTTAC 3'	3449-3469	Xba I
21. DENV4 E +	5' GAAGATCTATGCGATGCGTAGGAGTGGGGAAC 3'	939-962	Bgl II
22. DENV4 E Δ <sub>100</sub> -	5' CGTCTAGACCCCTTCCTGAACCAATGGAG 3'	2103-2123	Xba I

\* Contando a partir do 1º nucleotídeo do genoma

**Tabela 6.2. Amplicons gerados com através de reações de PCR utilizando-se os oligonucleotídeos listados na tabela 6.1. e os vetores em que cada amplicon foi clonado.**

<b>Amplicons</b>	<b>Oligonucleotídeos (Vide tabela 6.1)</b>	<b>Vetor</b>
1. DENV-1 prM/EΔ <sub>100</sub>	1 e 3	pMT/BiP/V5-His A
2. DENV-1 EΔ <sub>100</sub>	2 e 3	
3. DENV-1 NS1	4 e 5	
4. DENV-2 prM/EΔ <sub>100</sub>	6 e 8	
5. DENV-2 EΔ <sub>100</sub>	7 e 8	
6. DENV-2 NS1	9 e 10	
7. DENV-3 prM/EΔ <sub>100</sub>	11 e 13	
8. DENV-3 EΔ <sub>100</sub>	12 e 13	
9. DENV-3 NS1	14 e 15	
10. DENV-4 EΔ <sub>100</sub>	21 e 22	
11. DENV-3 EΔ <sub>100</sub> <i>c/ STOP</i>	12 e 17	pMT/V5-His A e pMT/V5-His –TOPO A
12. DENV-3 NS1 <i>c/ STOP</i>	14 e 20	
13. DENV-3 EΔ <sub>100</sub> <i>c/ STOP</i>	16 e 17	
14. DENV-3 IsNS1 <i>c/ STOP</i>	19 e 20	
15. DENV-3 ssNS1 <i>c/ STOP</i>	18 e 20	
16. DENV-3 EΔ <sub>100</sub> <i>s/ STOP</i>	16 e 13	
17. DENV-3 IsNS1 <i>s/ STOP</i>	19 e 15	
18. DENV-3 ssNS1 <i>s/ STOP</i>	18 e 15	

\*Os quadros preenchidos identificam as outras estratégias desenhadas para DENV-3



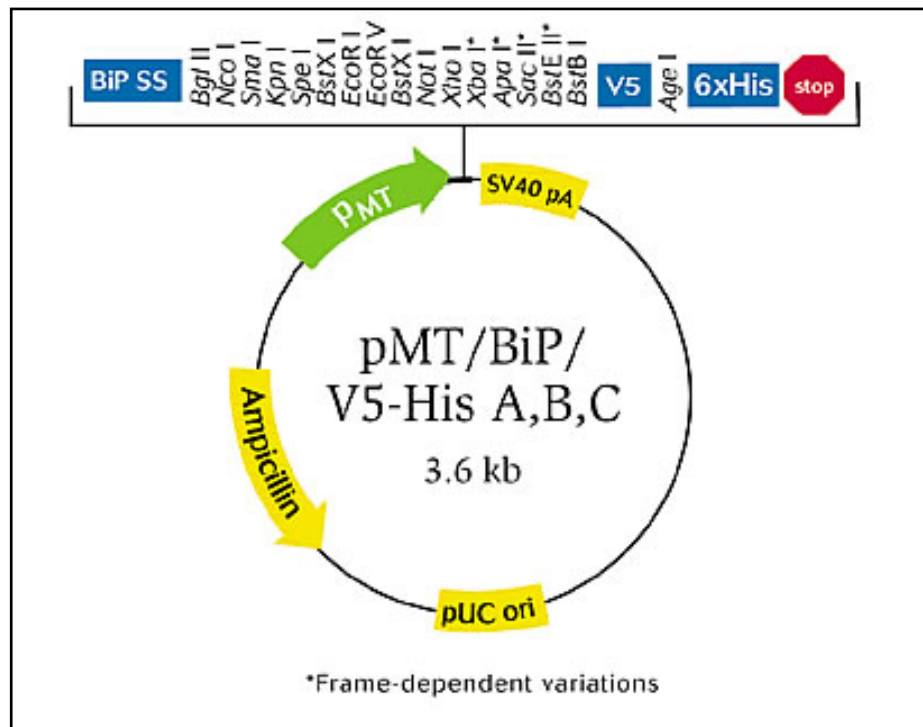
### 6.2.3 Clonagem de genes (prM/E $\Delta_{100}$ de DENV-1, -2 e -3, E $\Delta_{100}$ de DENV-1, -2, -3 e -4, NS1 de DENV-1, -2 e -3 e E $\Delta_{100}^{c/STOP}$ , NS1 $c/STOP$ , ssNS1 $c/STOP$ , lsNS1 $c/STOP$ , E $\Delta_{100}^{s/STOP}$ , ssNS1 $s/STOP$ e lsNS1 $s/STOP$ de DENV-3) e ligação aos vetores de expressão

#### - Clonagens no vetor pMT/BiP/V5-His A

Para clonagem neste vetor, uma das especificações do fabricante era que, para a expressão do gene de interesse, era necessário realizar as estratégias de clonagem na mesma fase de leitura com a sequência do vetor que codifica o peptídeo sinal BiP, localizado na porção amino-terminal. Além disso, era essencial a remoção de sequências sinais nativas do gene. Assim, para amplificação dos genes que codificam as proteínas E $\Delta_{100}$  e NS1, não foram inseridas as sequências sinais. Entretanto, para a expressão da proteína quimérica prM/E $\Delta_{100}$ , a sequência sinal da proteína envelope foi mantida. A relação dos fragmentos de DNA clonados neste vetor está representada na tabela 6.2.

Para clonagem dos genes correspondentes as proteínas prM/E $\Delta_{100}$  e E $\Delta_{100}$  de DENV-1, os produtos provenientes das reações de PCR, assim como o vetor pMT/BiP/V5-His A (Invitrogen, figura 6.1), foram tratados com as enzimas de restrição BglII 10U/ $\mu$ L (Roche Applied Science) e XhoI 20U/ $\mu$ L (New England Biolabs), enquanto para clonagem do DNA correspondente a proteína prM/E $\Delta_{100}$  de DENV-2, o produto da PCR e o vetor foram tratados pelas enzimas SmaI 20U/ $\mu$ L (New England Biolabs) e XbaI 20U/ $\mu$ L (New England Biolabs). A clonagem dos genes restantes, como prM/E $\Delta_{100}$  de DENV-3, E $\Delta_{100}$  de DENV-2, -3 e -4, E $\Delta_{100}^{c/STOP}$  de DENV-3, NS1 de DENV-1, -2 e -3 e NS1  $c/STOP$  de DENV-3 foram clivados pelas endonucleases de restrição BglII 10U/ $\mu$ L (Roche Applied Science) e XbaI 20U/ $\mu$ L (New England Biolabs), também utilizadas para digestão do vetor. Nas estratégias de clonagem para E $\Delta_{100}^{c/STOP}$  e NS1  $c/STOP$  de DENV-3 foram introduzidas a sequência para codificar 6xHis seguida de dois códons de término de tradução nos oligonucleotídeos negativos (itens 17 e 20, tabela 6.1). Assim, quando clonados no vetor pMT/BiP/V5-His e expressos, as proteínas não apresentavam os epítomos V5 e 6xHis situados na região carboxi-terminal do plasmídeo.

Todas as reações com as enzimas de restrição foram realizadas de acordo com os tampões e condições descritas pelos fabricantes das enzimas. Posteriormente estas reações foram purificadas de acordo com as especificações do kit *High Pure PCR* (Roche) e eluídas em 50 µL de água ultra-pura. Para reação de ligação dos insertos de DNA com os respectivos plasmídeos pMT/BiP/V5-His, as quantidades de DNA do vetor e inserto foram determinadas visualmente em géis de agarose. Utilizou-se uma relação de 1:3 (vetor:inserto), misturados com 1X de tampão de reação da T4 DNA ligase (USB), 1U da enzima T4 DNA ligase (USB) e água ultra-pura para um volume final de reação de 20 µL. As reações foram incubadas a 16 °C por 16 horas.



**Figura 6.1.** Mapa do vetor pMT/BiP/V5-His. FONTE: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

- Clonagens nos vetores pMT/ V5-His-TOPO A e pMT/V5-His-TOPO

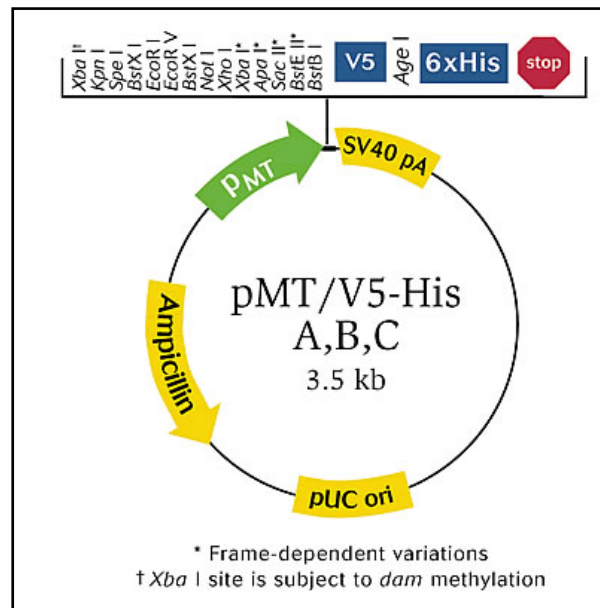
Foram desenhados oligonucleotídeos (itens 16 a 20, tabela 6.1), com algumas estratégias diversificadas para clonagem de EA<sub>100</sub>, ssNS1 e lsNS1 de DENV-3, nos vetores pMT/ V5-His A (Invitrogen) e pMT/V5-His-TOPO (Invitrogen), representados pelas figuras 6.2 e 6.3, respectivamente. Para clonagem neste último, a presença de

uma sequência de Kozak CAAC, seguida de um códon de iniciação ATG, eram essenciais nos oligonucleotídeos positivos (itens 16, 18 e 19, tabela 6.1). Para clonagem no vetor pMT/V5-His A eram necessários sítios para enzimas de restrição tanto nos oligonucleotídeos positivos como negativos. Em alguns oligonucleotídeos negativos para clonagem tanto em pMT/V5-His A como pMT/V5-His-TOPO, a presença de códons de parada de tradução (itens 17 e 20, tabela 6.1) foi outra estratégia alternativa. Além disso, os vetores permitem a inserção de sequências sinais nativas, sendo que para NS1 foram inseridas duas prováveis sequências, localizadas na extremidade carboxi-terminal da E. Uma sequência sinal curta, com 63 nucleotídeos à montante do gene de NS1(ss) e outra, longa, com 84 nucleotídeos à montante do gene de NS1 (ls) (itens 18 e 19 tabela 6.1). A relação dos fragmentos de DNA clonados neste vetor está representada na tabela 6.2.

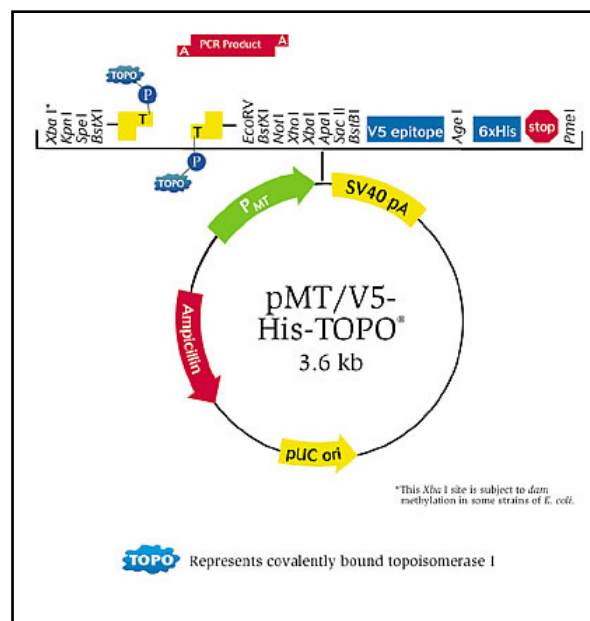
Para a clonagem no vetor pMT/V5-His A dos segmentos DNA correspondentes as proteínas  $E\Delta_{100}^{c/STOP}$ ,  $E\Delta_{100}^{s/STOP}$ ,  $ssNS1^{c/STOP}$ ,  $ssNS1^{s/STOP}$ ,  $lsNS1^{c/STOP}$  e  $lsNS1^{s/STOP}$  foram utilizadas as enzimas de restrição SpeI 50U/ $\mu$ L (Amersham) e XbaI 20U/ $\mu$ L (New England Biolabs). Todas as reações foram realizadas de acordo com os tampões e condições descritas pelos fabricantes e posteriormente purificadas de acordo com as especificações contidas na bula do kit *High Pure PCR* (Roche) e as amostras de DNA recuperadas em 50  $\mu$ L de água ultra-pura. Para as reações de ligação dos insertos de DNA com os respectivos plasmídeos pMT/V5-His, as quantidades de DNA do vetor e inserto foram determinadas através de visualização em gel de agarose. Utilizou-se uma relação de 1:3 (vetor:inserto), misturados com 1X de tampão de reação da T4 DNA ligase (USB), 1U da enzima T4 DNA ligase (USB) e água ultra-pura para um volume final de reação de 20  $\mu$ L. As reações foram incubadas a 16 °C por 16 horas.

Na clonagem dos mesmos fragmentos de DNA descritos acima no vetor pMT/V5-His-TOPO, os produtos das reações de PCR foram diretamente ligados no vetor, sendo desnecessário o tratamento com enzimas de restrição. Durante as reações com a enzima Taq DNA polimerase utilizada (*TripleMaster*, Eppendorf) há a adição de uma única adenina (A) nas extremidades 3' dos produtos de PCR enquanto o vetor linearizado fornecido contém uma única timina (T) suspensa na extremidade 3'. Assim, o produto de PCR é eficientemente ligado ao vetor, devido à ativação da topoisomerase I ligada covalentemente ao mesmo. Assim, os produtos de PCR foram diretamente clonados neste vetor de acordo com as instruções do

fabricante. Utilizou-se a relação 1:3 (vetor:inserto), em que o fragmento de DNA a ser clonado e o vetor pMT/BiP/V5-His TOPO (10 ng/ $\mu$ L, Invitrogen) eram misturados com uma solução salina (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl<sub>2</sub>, Invitrogen) para um volume final de 6  $\mu$ L. A reação era incubada por 5 minutos em temperatura ambiente.



**Figura 6.2.** Mapa do vetor pMT/V5-His. FONTE: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)



**Figura 6.3.** Mapa do vetor pMT/V5-His-TOPO. FONTE: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

#### **6.2.4 Transformação de plasmídeos em linhagens bacterianas *E.coli***

Para transformação de bactérias competentes com as ligações de inserto-vetor, foi utilizado todo volume das reações de ligação descritas anteriormente. Para cada transformação, um tubo com 100  $\mu$ L de células quimicamente competentes da linhagem TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) foram descongeladas em banho de gelo. Em seguida, todo volume da ligação era adicionado. Esta mistura era mantida no gelo por 30 min e posteriormente submetida a um choque térmico a 42 °C por 2 min. Para a recuperação das células transformadas, eram adicionados 500  $\mu$ L de meio SOC e incubados a 37 °C por 1 hora, sob agitação constante. Após este período, alíquotas de 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L e o volume restante das bactérias transformadas eram semeadas em placas contendo meio LB sólido suplementado com 100  $\mu$ g/mL de ampicilina e incubadas a 37 °C por 18 horas. Após a verificação do crescimento de possíveis colônias recombinantes na placa, era feita uma placa mãe também com meio LB sólido/ampicilina, contendo um papel quadriculado e numerado colado na placa, para identificação de cada eventual clone. As colônias contendo potenciais clones eram transferidas da placa de crescimento para um quadrado numerado da placa mãe, com o auxílio de um palito de dente estéril, e incubado a 37 °C por 18 horas.

#### **6.2.5 Seleção dos clones recombinantes**

A análise das colônias bacterianas para detecção de plasmídeos recombinantes era realizada pela técnica de palitagem, com exceção dos clones ligados ao vetor pMT/V5-His- TOPO. Na técnica de palitagem (*toothpick*), descrita por Barnes (1977), uma colônia identificada por um número é passada da placa mãe, com auxílio de um palito de dente estéril, a um tubo tipo eppendorf (identificado com o número correspondente). À cada colônia adicionava-se 20  $\mu$ L de tampão de lise e incubava-se a 65°C por 10 minutos. As amostras eram então aplicadas, assim como o plasmídeo nativo sem inserto (controle), em géis de agarose 0,8%. Após a coloração do gel em solução com 0,5  $\mu$ g/mL de brometo de etídio, os plasmídeos recombinantes eram detectados pela diferença de peso molecular quando comparados com o controle. As colônias contendo os prováveis clones recombinantes eram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido com 100  $\mu$ g/mL de ampicilina e crescidas a 37 °C por 18 horas sob agitação constante. Para a

confirmação dos clones recombinantes, ligados ao plasmídeo linearizado pMT/V5-His- TOPO, a técnica utilizada era a de PCR de colônia. Assim como na técnica de palitagem, uma colônia identificada por um número é passada da placa mãe, com auxílio de um palito de dente estéril, a um tubo eppendorf (identificado com o número correspondente). Adicionava-se 20 µL de água ultra-pura e cada tubo era incubado a 98°C por 10 minutos. Em seguida, os tubos eram centrifugados a 14000 r.p.m. por 1 minuto e 1µL do sobrenadante era transferido para outro tubo eppendorf ao qual eram adicionados 1,5 µL de 10x tampão comercial para reação (Invitrogen), 1,2 µL de 2,5 mM dNTPs, 0,45 µL de 50mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,075 µL Taq Polimerase (5U/ µL, Invitrogen), 1,5 µL dos mesmos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do genes (tabela 6.1) e água ultra-pura para volume final de 15 µL. Esta reação era submetida a um ciclo a 94 °C por 5 min e a 40 ciclos a 94 °C por 30 seg., a 52 ° C por 30 seg. e a 72 °C por 2 min. Alíquotas das amostras de DNA amplificadas (1:10) foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Os plasmídeos recombinantes eram detectados pela amplificação positiva. As colônias contendo os prováveis clones recombinantes eram inoculadas em 3 mL de meio LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina e crescidas a 37 ° por 18 horas sob agitação constante.

#### **6.2.6 Minipreparação e sequenciamento**

As culturas de bactérias crescidas em meio líquido eram sedimentadas por uma breve centrifugação para minipreparação dos plasmídeos com o *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Naqueles clones recombinantes que não foram submetidos à PCR de colônia, a presença de insertos correspondentes aos genes de interesse nos plasmídeos foi confirmada em gel de agarose após a reação de uma alíquota da minipreparação com enzimas de restrição capazes de liberar o inserto. Todos os clones positivos foram estocados em glicerol 50% v/v, num volume total de 1mL, a -80 °C.

Alíquotas das minipreparações, juntamente com os oligonucleotídeos descritos na tabela 6.3 foram enviadas para MacroGen (Coréia do Sul), para seqüenciamento. Todas minipreparações foram seqüenciadas utilizando-se dois oligonucleotídeos, MT e BGH, situados nos vetores pMT/BiP/V5-His, pMT/V5-His e pMT/V5-His-TOPO e flanqueando os sítios de clonagem. Para seqüenciar o clone recombinante de DENV-1 EΔ<sub>100</sub>, DENV-2 EΔ<sub>100</sub>, DENV-2 NS1, DENV-3 EΔ<sub>100</sub> e DENV-3 NS1, foram utilizados os oligonucleotídeos adicionais CN41, D2 meio E-, CTB04+, D3-3- e D3-40+, respectivamente.

**Tabela 6.3. Oligonucleotídeos presentes nos vetores e no genoma de DENV utilizados para as reações de sequenciamento nucleotídico**

OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA	REGIÃO GENÔMICA*	VÍRUS
1. MT +	5' CATCTCAGTGCAACTAAA 3'	---	*
2. BGH -	5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'	---	*
3. CN41 -	5' CCACCACCGATTCAAGATGTCCAACACAAGG 3'	1137-1167	DENV1
4. D2MEIO E -	5' AGCCAAGCTTTGTCTTCCATCTGCAGCAG 3'	1528-1556	DENV2
5. CTB04 +	5' CGGCCCCAGCCCACTGAGC 3'	2734-2752	DENV2
6. D3-3 -	5' GTGGTTGATGCCTGAGGTG 3'	1432-1440	DENV3
7. D3-40 +	5' CTGAACCACATATTGTGGG 3'	2636-2654	DENV3

\* Contando a partir do 1º nucleotídeo do genoma

### 6.2.7 Transfecção transitória de clones recombinantes em células S2 de *Drosophila*

Para os ensaios de transfecção dos clones recombinantes caracterizados em células S2 (figura 6.4), era necessária uma maior quantidade de DNA plasmidial, que foi obtida através da preparação em escala média com o kit *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega). A purificação dos plasmídeos recombinantes seguiu as instruções do fabricante e o DNA foi recuperado em 300 µL de solução de eluição. As amostras eram então precipitadas pela adição de etanol absoluto (3 vezes o volume) e 3M acetato de sódio pH 5,2 (1/10 do volume) e mantidas a -20 °C por 16 horas. Após esse período o material era centrifugado a 16000 x g por 15 min, lavado com etanol 70% e centrifugado novamente, por 10 min. As amostras de DNA plasmidial precipitadas eram secas em temperatura ambiente, em seguida recuperadas com água ultra-pura estéril para uma concentração final de 0,5 µg/µL e

estocadas a 4 °C se o uso era imediato. Os ensaios de transfecção seguiram as instruções contidas no manual do kit *Drosophila Expression System*, Invitrogen.

Resumidamente,  $3 \times 10^6$  de células S2/ poço eram semeadas (para uma placa de 6 poços, de 35 mm de diâmetro), em 3 mL do meio de cultivo Schneider suplementado com 10% SFB (Gibco/Invitrogen) e 5mL/L da solução de penicilina-estreptomicina (Gibco/Invitrogen), denominado meio completo. Após 16 h de incubação a 28°C, as células S2 eram transfectadas com o DNA dos plasmídeos recombinantes utilizando fosfato de cálcio. Neste método, 19 µg de DNA recombinante eram misturados a 36 µL de uma solução 2M cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e água ultra-pura estéril até o volume de 300 µL. Esta solução foi misturada, por gotejamento a 300 µL da solução 2x HBS (50mM HEPES, 1.5mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 280mM NaCl, de pH 7,1). A mistura era incubada à temperatura ambiente por cerca de 40 minutos, para que ocorresse a precipitação do DNA. Após esse período, a solução era adicionada aos poços contendo as células e as placas incubadas a 28° C, por 20 horas. Como controle positivo de transfecção, foi usado o vetor pMT/BiP/V5-His/GFP e como controle negativo, mock, o vetor pMT/BiP/V5-His (sem inserto). Após o período de incubação, as células eram lavadas para remoção da solução de fosfato de cálcio. Como o vetor de clonagem apresenta a seqüência do promotor metalotioneína de *Drosophila* (MT), a adição de 500 µM  $\text{CuSO}_4$  (sulfato de cobre) nas culturas de células transfectadas era necessária para a indução do mesmo e expressão das proteínas recombinantes. A solução de  $\text{CuSO}_4$  era adicionada a cada poço 48 horas após a transfecção, ou seja, 24 horas após a lavagem das células. As células eram incubadas a 28 °C por 72 horas, até a recuperação através de raspagem e em seguida, transferidas, juntamente com o meio de cultivo, para tubos tipo eppendorf para serem centrifugadas a 100 x g por 10 min. Os sedimentos de células eram então separados dos sobrenadantes e as amostras eram estocadas para o ensaio de expressão de proteínas. Ressaltando que, o sobrenadante era estocado somente nos casos dos clones recombinantes que apresentassem o peptídeo de secreção BiP. Para a verificação da expressão das proteínas recombinantes, em géis de SDS/PAGE, era utilizada uma alíquota de cada sobrenadante pós-transfecção/indução acrescida de 4X tampão de amostra. Para a análise da expressão das proteínas nas amostras de células, após lavagem com 1X PBS e centrifugação a 100 x g por 10 min, as amostras eram lisadas pela adição de uma solução de lise de células de *Drosophila* (50 mM Tris, pH 7.8, 150 mM NaCl e



1% NP-40) por 10 minutos a 37 °C. Após a lise, o material era centrifugado novamente para remoção de células e ao sobrenadante era adicionado tampão de amostra.

Alíquotas de células e sobrenadante foram então analisadas em géis SDS-PAGE a 13%, corados com *azul de comassie*. A identidade das proteínas foi confirmada pela técnica de *Western-blot*, descrita por Towbin, Staehelin e Gordon (1979), utilizando anticorpos específicos. nesta técnica, as proteínas recombinantes são transferidas do gel SDS-PAGE para membranas de nitrocelulose (Hybond C, Amersham), por 16 horas, a 4 °C, a 24 V. Após a transferência, as proteínas eram inicialmente visualizadas nas membranas através da coloração com solução de Ponceau S, por 5 min, a temperatura ambiente. As bandas do padrão de peso molecular (Benchmark™ Protein Ladder, Invitrogen, ou 6H, Sigma) utilizado eram visualizadas e marcadas com caneta esferográfica para posterior estimativa do peso molecular das proteínas recombinantes. Após lavagem com água destilada para a retirada da solução de Ponceau, as membranas eram saturadas com a solução 1X TBS/5% leite, a temperatura ambiente, por 1 hora. Em seguida, eram incubadas primeiramente com anticorpo específico contra o vírus DENV-1,-2, -3 ou -4, diluídos 1:250, ou anticorpo monoclonal dirigido contra o epítipo V5, diluído 1:5000 (Invitrogen). Todas as diluições eram realizadas em solução 1X TBS/5% leite. Após incubação por 1 hora a 37 °C sob agitação, as membranas eram lavadas três vezes com 1X TBS, por 5 min., a temperatura ambiente. A incubação com o anticorpo secundário IgG anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Promega), diluído 1:7500, e as lavagens subsequentes, seguiram o protocolo descrito anteriormente. A revelação era realizada com a adição de 10 mL de tampão fosfatase alcalina (AP- buffer) acrescido dos substratos da enzima, 33 µL de BCIP (50mg/mL, Promega) e 66 µL de NBT (50mg/mL, Promega) por aproximadamente 15 min., ao abrigo da luz.

### 6.2.8 Padronização da expressão de proteínas heterólogas no sistema de células de *Drosophila*

Para a padronização do sistema de expressão em células S2, realizamos várias cinéticas para avaliar os protocolos mais eficientes com relação a quantidade de proteínas recombinantes produzidas. Para a indução dos clones recombinante de DENV-4 E $\Delta_{100}$ , foram determinados os tempos de 24, 48, 72 e 96 horas após a transfecção. O clone recombinante foi transfectado, como descrito anteriormente, em quatro poços de 35mm e o protocolo seguido da mesma maneira até a lavagem das células. Diferentemente, a indução pela adição de 500  $\mu$ M de sulfato de cobre ocorreu 24, 48, 72 ou 96 horas após a transfecção e as células foram incubadas por 72 horas até recuperação das mesmas para ensaio da expressão por *western-blot* como já descrito. Em um experimento paralelo, a cinética de recolhimento das células e sobrenadante, também realizada com o clone recombinante de DENV-4 E $\Delta_{100}$ , foi para testar se o pico da expressão de proteínas era 48, 72, 96 ou 120 horas após a indução. Novamente, o clone recombinante foi transfectado, como descrito anteriormente. As células foram lavadas, e a indução com 500  $\mu$ M de sulfato de cobre ocorreu 72 horas após a transfecção. Após a indução, as células e meio de cultivo foram recolhidos nos tempos de 48, 72, 96 ou 120 horas para o ensaio de expressão por *western-blot*. A determinação dos tempos ótimos de indução e recolhimento para o máximo de síntese das proteínas recombinantes foi estabelecido para todos os clones.

Visando ainda melhorar o rendimento da expressão de proteínas recombinantes foram testadas outras metodologias. Para testar a concentração de sulfato de cobre para a expressão mais significativa de proteínas,  $3 \times 10^6$  de células S2/ poço foram semeadas em placas de seis orifícios, e incubadas por 16 horas a 28 °C. A transfecção de três dos poços foi realizada com o plasmídeo sem inserto pMT/BiP/V5-His (mock) enquanto os outros três foram transfectados com o clone recombinante prM/E $\Delta_{100}$  de DENV-3. A transfecção seguiu o protocolo descrito anteriormente (tópico 6.2.7) e 24 horas após a lavagem das células, foram adicionados 500, 700 e 1000  $\mu$ M de CuSO<sub>4</sub> aos poços transfectados com o clone recombinante. O mesmo foi realizado para as células transfectadas com o plasmídeo controle e a placa foi incubada por 72 horas a 28 ° C. Em seguida, as células foram

recolhidas da placa por raspagem, centrifugadas e o sedimento estocado para ensaios em citômetro de fluxo.

Para se testar a metodologia de transfecção que produzisse a expressão máxima de proteínas recombinantes em células de *Drosophila*, preparou-se uma placa de 6 poços (com 35 mm cada) com  $3 \times 10^6$  de células S2/ poço em 3mL de meio Schneider completo, que foi incubada por 16 horas a 28 °C. Foram transfectados o plasmídeo pMT/BiP/V5-His (mock) como controle negativo e o clone recombinante prM/EA<sub>100</sub> de DENV-3, utilizando-se a metodologia de fosfato de cálcio, já descrita no tópico 6.2.7. Outros dois poços foram transfectados também com o mock e o clone recombinante, porém, utilizando-se o reagente *Cellfectina* (Invitrogen) de acordo com o manual do fabricante. Esta metodologia está baseada no princípio de que lipossomos catiônicos sintéticos interagem eletrostaticamente com cargas negativas do DNA e formam um complexo o qual se funde com a membrana plasmática da célula, permitindo a entrada da molécula de DNA na mesma (FELGNER *et al.*, 1987). Neste ensaio 6 µL de *Cellfectina* e meio Schneider sem soro até um volume de 100 µL. Em outro tubo eram misturados 2 µg do clone recombinante (ou do vetor sem inserto) com 94 µL de meio Schneider sem soro. Os conteúdos dos dois tubos eram então misturados e incubados 15 min em temperatura ambiente e em seguida, adicionado 800 µL de meio Schneider sem soro. Esta solução era transferida para o respectivo poço da placa, no qual o meio Schneider completo fora substituído por 2 mL de meio sem soro, através de centrifugação a 100 x g por 5 min. Ainda para se determinar o reagente mais eficiente no processo de transfecção dos plasmídeos recombinantes, foi utilizado o reagente *Lipofectina* (Invitrogen), e os dois plasmídeos descritos acima. Foram seguidas as indicações do manual do fabricante. O princípio desta metodologia é semelhante àquela descrita para *Cellfectina*, e em resumo, eram misturados 2 µg do clone recombinante (ou do vetor sem inserto) com 94 µL de meio Schneider sem soro em um tubo. No outro, 10 µL de lipofectina eram misturados com 90 µL de meio Schneider sem soro e essa mistura incubada por 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, os conteúdos dos dois tubos eram misturados e incubados 15 min em temperatura ambiente para o acoplamento do DNA aos lipídeos. Durante a incubação, o meio das culturas de células era removido e substituído com 2 mL de meio sem soro, através de centrifugação a 100 x g por 5 min. Após 15 min, eram adicionados 800 µL de meio Schneider sem soro à mistura,

e a solução transferida ao seu respectivo poço. Todas as transfecções foram incubadas a 28 °C por 16 horas e em seguida as células foram lavadas por centrifugação a 100 x *g* por 10 min e recuperadas em 3 mL de meio Schneider completo para uma incubação por 20 horas. Posteriormente, foram adicionados 500 µM de CuSO<sub>4</sub> em cada poço e novamente incubados, por 72 horas. Finalmente, as células foram recolhidas por raspagem, centrifugadas e o sedimento estocado para ensaio por citometria de fluxo.

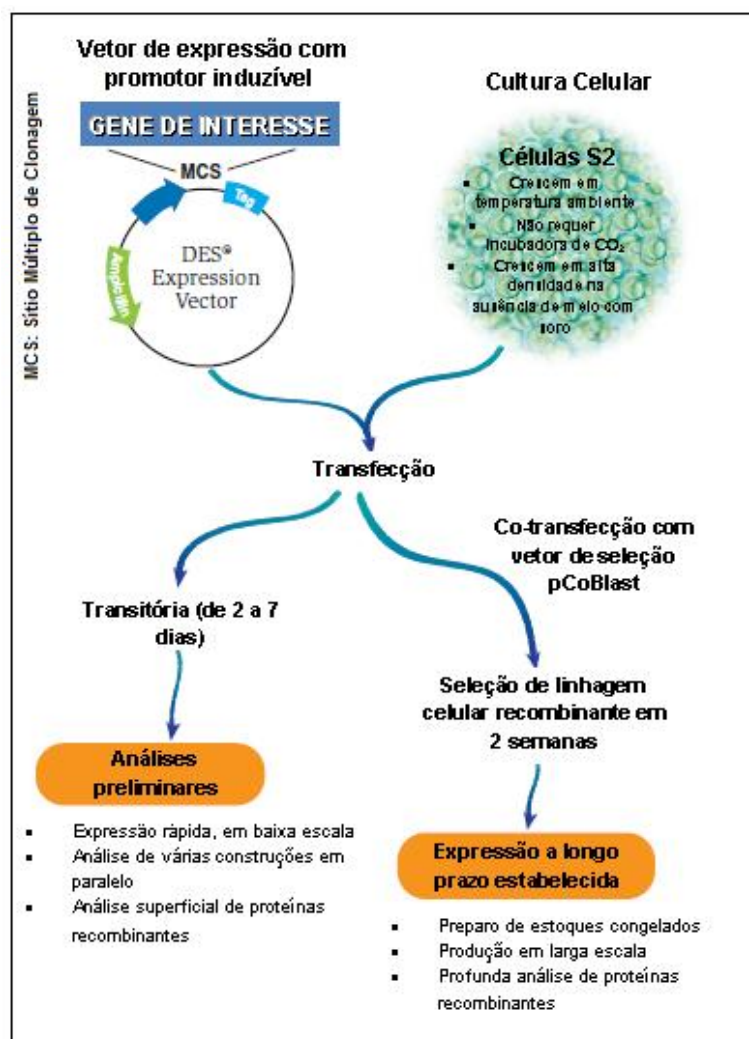
### **6.2.9 Ensaios de citometria de fluxo**

Para os ensaios de citometria de fluxo, os sedimentos celulares recuperados foram lavados duas vezes com 1 mL de 1X PBS/ 0,05% Tween (Tampão de lavagem) através de centrifugação a 1300 x *g* por 4 min. Após a última centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em 300 µL de tampão de permeabilização (solução 1:1 de *FACS Lysing Solution* 10%/paraformaldeído 4%), e incubado 10 minutos a temperatura ambiente, sob abrigo da luz. Em seguida, foi adicionado tampão de lavagem até o volume final de 1mL e as amostras foram centrifugadas a 1300 x *g* por 4 min. Em seguida a lavagem foi repetida, e o sedimento celular foi incubado com o anticorpo policlonal anti-DENV3 (diluído 1:200 em 1X PBS) por 45 minutos a 37 °C, seguido de duas lavagens como descrito acima. Posteriormente as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário IgG anti-camundongo conjugado com picroeritrina (PE) (e-Bioscience) diluído 1:250 em 1X PBS por 45 min a 37 °C e ao abrigo da luz. Finalmente as células foram lavadas duas vezes, como já descrito, e, o sedimento de células foi ressuspenso para um volume final de 1 mL de 1X PBS estéril e mantido a 4 °C até leitura do número de células expressando a proteína pelo citômetro de fluxo. O citometro de fluxo utilizado foi o BD FACSCalibur (Bencton Dickinson) e o número total de eventos analisados foi de 20.000. Para análise do número de células expressando a proteína recombinante, bem como, da intensidade da expressão foi utilizado o software de análise FlowJo ([www.flowjo.com](http://www.flowjo.com)).

### 6.2.10 Seleção de linhagens estáveis de células S2

Depois de caracterizadas as proteínas recombinantes, iniciou-se o processo para gerar linhagens de células S2 recombinantes estáveis, na qual o gene de interesse passa a integrar o genoma da célula, e deste modo há um incremento na taxa de expressão das proteínas recombinantes (Figura 6.4). Para tal, foram realizados ensaios de co-transfecção do plasmídeo recombinante e o plasmídeo denominado pCoBlast (Invitrogen). O pCoBlast contém o promotor do gene *cop* de *Drosophila*, que permite a expressão do gene de resistência ao antibiótico blasticidina (bsd) isolado de *Streptomyces griseochromogenes* (KIMURA, 1994). Os ensaios de co-transfecção foram feitos utilizando a mesma metodologia descrita para os ensaios de transfecção transiente (tópico 6.2.7), exceto pela adição de 1 µg do pCoBlast à transfecção. Após a lavagem, as células eram incubadas por dois dias a 28 °C. Passado este período, as culturas celulares eram lavadas novamente com meio de cultivo e o sedimento ressuspensado em meio Schneider completo complementado com 25 µg/µL do antibiótico blasticidina (Invitrogen) para seleção de linhagens recombinantes de células. O meio de cultivo era trocado a cada quatro dias, por aproximadamente duas semanas, para seleção das células resistentes à blasticidina. Para tal, as células semi-aderentes, presentes no meio de cultivo dos poços, eram centrifugadas a 100 x g por 10 min e o sedimento celular ressuspensado com meio Schneider completo (sempre com a adição de blasticidina) e recolocado no mesmo poço. Posteriormente a seleção, as células eram recuperadas por raspagem dos poços e todo volume era centrifugado a 100 x g por 10 min. Os sedimentos eram ressuspensos com 5 mL de meio Schneider completo, suplementados com 25 µg/µL de blasticidina transferidos para garrafas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> e as culturas de células incubadas a 28 °C. Quando as culturas atingiam uma densidade de aproximadamente 5x10<sup>6</sup> células/mL, as células eram recuperadas e ressuspensas em meio de cultura. Através de contagem em câmara hemocitométrica, 3x10<sup>6</sup> células/mL eram semeadas em poços de 35 mm contendo 3 mL de meio Schneider completo suplementado com 25 µg/µL de blasticidina, e incubadas por 16 horas. Em seguida, ao meio de cultura era adicionado 500 µM de CuSO<sub>4</sub> e 72 horas depois da indução, as células eram recuperadas por raspagem para ensaios da expressão de proteínas por *Western-blot*, como descrito no tópico 6.2.7.

Para expansão das culturas de células que expressavam as proteínas recombinantes de forma estável, as células eram recuperadas e ressuspensas no próprio meio de cultura quando atingiam a densidade de aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/mL. Geralmente, 1 mL da suspensão de células era diluído em 14 mL de meio Schneider completo com 25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de blasticidina e os 15 mL totais eram semeados em garrafas de cultivo de 75  $\text{cm}^2$ , incubadas a 28 °C. Novamente, quando atingissem a densidade de  $5 \times 10^6$  células/mL, as culturas de células eram recuperadas e ressuspensas no próprio meio de cultura, dos quais 2 mL da suspensão de células eram diluídas em 28 mL de meio Schneider completo suplementado com 25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de blasticidina, e semeados em garrafas de 150  $\text{cm}^2$ , incubadas a 28 °C.



**Figura 6.4.** Esquema de transfecção transitória e co-transfecção estável de plasmídeos com o gene de interesse em cultura de células S2 e a expressão das proteínas recombinantes. FONTE: Adaptado e modificado de [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)

### **6.2.11 Processo de congelamento das linhagens estáveis de células recombinantes**

Para o congelamento das linhagens estáveis de células recombinantes, as células em expansão mantidas em garrafas de 150 cm<sup>2</sup> eram recuperadas por raspagem no próprio meio de cultivo e todo volume (30 mL) era diluído em 20 mL de meio Schneider completo complementado com 25 µg/µL de blasticidina. A garrafa era então incubada a 28 °C por 48 horas, período necessário para as células atingissem uma densidade de  $1 \times 10^7$  células/mL. As células eram então recuperadas por raspagem e as células contadas através de uma câmara hemocitométrica. Em seguida, era determinada a quantidade de meio de congelamento necessária para uma densidade final de  $\geq 1 \times 10^7$  células/mL. O preparo do meio de congelamento, sempre imediatamente antes do uso, era realizado adicionando-se 50% de meio Schneider completo novo, 50% de meio Schneider completo condicionado (meio retirado da cultura de células S2 não transfectadas), 10% de DMSO (Sigma) e 25 µg/ul de blasticidina. Após esterilização por filtração, o meio era estocado a 4 °C até o momento de uso. A suspensão de células ressuspensas eram centrifugadas a 100 x g por 10 min e o sedimento celular era recuperado com a quantidade de meio de congelamento determinada previamente. Alíquotas de 1mL eram distribuídas em criotubos, os quais eram mantidos a - 20 °C por 30 min e a - 80 °C por 16 horas até serem transferidos e conservados em nitrogênio líquido. O descongelamento destas células ocorria no mínimo, 24 horas após o congelamento. Um criotubo era descongelado em banho-maria a 30 °C e antes que todo conteúdo descongelasse, o mesmo era transferido para uma garrafa de 25 cm<sup>2</sup> com 4 mL de meio Schneider completo com 25 µg/ul de blasticidina. A garrafa era mantida por no mínimo 4 horas a 28 °C e em seguida, todo meio de cultura e células semi-aderentes eram recolhidos e centrifugados a 100 x g por 10 minutos para remoção do DMSO. O sedimento celular era recuperado novamente em 5 mL de meio Schneider completo com 25 µg/ul blasticidina e semeado em garrafa de 25 cm<sup>2</sup> e incubado a 28 °C até que as células apresentassem uma densidade de  $5 \times 10^6$  células/mL, ideal para subcultura. Como descrito anteriormente, as células eram recuperadas no próprio meio de cultura e através de contagem em câmara hemocitométrica,  $3 \times 10^6$  células/mL eram semeadas em poços de 35mm com 3mL de meio Schneider completo com 25 µg/µL de blasticidina e incubadas por 16 horas. Em seguida, ao

meio de cultura era adicionado 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  e 72 horas depois da indução, as células eram recuperadas centrifugadas a 100 x g por 10 min e submetidas ao ensaio para detecção da expressão das proteínas por *Western-blot* como descrito no tópico 6.2.7.

#### **6.2.12 Ensaio de Purificação da proteína recombinante prM/E $\Delta_{100}$ de DENV-3**

Garrafas de 25  $\text{cm}^2$  foram semeadas com  $5 \times 10^6$  células S2 em 5mL de meio de cultivo Schneider completo. A transfecção foi efetuada como descrita anteriormente (tópico 6.2.7) e utilizou-se o plasmídeo recombinante com o gene prM/E $\Delta_{100}$  de DENV-3 ou o plasmídeo vazio como controle negativo. A transfecção foi feita em triplicata, com exceção do controle negativo. Após 72 horas à indução, as células foram recuperadas no próprio meio de cultura, centrifugadas a 100 x g por 10 min e o sobrenadante (15 mL) foi submetido ao processo de purificação. Duas etapas de purificação foram seguidas, a primeira, de troca iônica, para retirar contaminantes do meio extracelular como  $\text{CuSO}_4$ , que pode interferir na ligação de proteínas fusionadas com His à resina de afinidade à metais (segunda etapa de purificação). Duas metodologias de troca iônica foram realizadas. Em uma delas, 10 mL do sobrenadante foram dialisados com uma solução de 50mM Tris-HCl pH 7.5 e 300mM NaCl a 4°C, sob agitação. Esta solução era trocada a cada 12 horas, por 3 vezes e em seguida o eluído foi estocado. Na outra metodologia, uma coluna de dessalinização (*PD-10 Desalting column*, Amersham) foi utilizada para os 5mL restantes de sobrenadante. Esta coluna foi equilibrada com 20 mL de Tris-HCl pH 7.5, o volume da proteína adicionado e o eluído estocado. Os 5mL do sobrenadante do controle negativo também foram submetidos à coluna de dessalinização. Após esta primeira etapa de purificação, 1mL da resina *Talon Metal Affinity resin* (BD-Biosciences) foi adicionada a cada um dos eluídos, e incubados a 4°C, sob agitação constante, por 3 horas. Após este período, iniciou-se a etapa de purificação. Primeiramente, foi estocado o que não se ligou à resina e esta foi lavada duas vezes com 5mL de buffer de lavagem (50mM Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl e 10mM Imidazol). A eluição da proteína foi com 1mL de 50mM Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl e 150mM Imidazol e três vezes com 1 mL da mesma solução, porém com 300mM Imidazol. Alíquotas de todas as etapas eram visualizadas por coloração em



gel SDS-PAGE 13% assim como ensaio da expressão da proteína através da técnica de *Western-blot*.

#### **6.2.13 Purificação de proteínas recombinantes de E $\Delta_{100}$ DENV-1, -2, -3 e -4 e prM/E $\Delta_{100}$ de DENV-3**

Para purificação de proteínas de E $\Delta_{100}$  de DENV-1, -2, -3 e -4 e prM/E $\Delta_{100}$  de DENV-3, as células S2 recombinantes, mantidas em garrafas de 150 cm<sup>2</sup> foram recuperadas no próprio meio de cultura e contabilizadas através de câmara hemocitométrica. Um total de  $3 \times 10^7$  células/ mL eram semeadas em garrafas de 150 cm<sup>2</sup> com 30 mL de meio Schneider completo com 25 µg/µL de blasticidina e incubadas a 28 °C por 16 horas. Em seguida, 500 µM de CuSO<sub>4</sub> eram adicionados ao meio de cultura e as garrafas incubadas por 72 horas. Após esse período, as células eram recuperadas no próprio meio de cultura, centrifugadas a 100 x g por 10 min, no qual o sobrenadante era estocado para purificação.

Uma coluna de dessalinização (*PD-10 Desalting column*, Amersham) foi utilizada para passar os 30mL de meio extracelular e remover o CuSO<sub>4</sub>. Esta coluna foi previamente equilibrada com 20 mL de 50mM Tris-HCl pH 7.5, o sobrenadante adicionado e o eluído estocado. Após esta primeira etapa de purificação, 500 µL da resina *Talon Metal Affinity resin* (BD-Biosciences) previamente equilibrada foi adicionada a cada um dos eluídos, e incubados a 4°C, sob agitação constante, por 4 horas. Para purificação, estocou-se o que não se ligou à resina e em seguida foi adicionado duas vezes 5mL de buffer de lavagem (50mM Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl e 10mM Imidazol). A eluição da proteína foi realizada em três etapas com 250 µL 50mM Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl e 500mM Imidazol ). Alíquotas de todas as etapas eram visualizadas por coloração em gel SDS-PAGE 13% e o ensaio da expressão das proteínas foi através da técnica de *Western-blot*.

#### **6.2.14 Western-blot de proteínas recombinantes para teste com soros humanos**

Alíquotas das proteínas recombinantes E $\Delta_{100}$  e prM/E $\Delta_{100}$  de DENV-3, clonadas em pMT/BiP/V5-His, expressas e purificadas (tópico 6.2.12), juntamente com uma alíquota do sedimento de célula que expressou a proteína recombinante NS1, também de DENV-3, foram aplicadas em géis SDS-PAGE 13 % . Como controle positivo, foi utilizada a proteína recombinante DomB (correspondente aos nucleotídeos 1831 ao 2125, contando a partir do primeiro nucleotídeo do genoma) de DENV-3, produzida por BORBA, 2004. Esta proteína foi expressa em M15 (*E. coli*), purificada e aplicada em gel SDS-PAGE 15%. Cada proteína (E $\Delta_{100}$  e prM/E $\Delta_{100}$  e DomB) foi aplicada oito vezes em função de ensaios por *Western-blot* com soros humanos, provenientes do LACEN (Laboratório Central), positivos para IgG anti-dengue ou IgM anti-dengue.

Após eletroforese, transferência para membranas de nitrocelulose, saturação das mesmas com 1X TBS/5% leite por 1 hora, cada amostra de proteína foi reagida com sete soros humanos. Os soros identificados como 111, 118, IVA e KAW são positivos para imunoglobulina IgM, enquanto os soros 114, 119 e 121 são positivos para imunoglobulina IgG. Como controle para as proteínas de DENV-3, foi usado o anticorpo policlonal anti-DENV3. Com exceção do anticorpo policlonal, que foi diluído 1:250, todos soros foram diluídos 1:100 em 1X TBS/5% leite e a incubação ocorreu a 37 °C por 1 hora. As membranas eram lavadas três vezes com 1X TBS, por 5 min., a temperatura ambiente e em seguida, incubadas novamente a 37 °C por 1 hora com o anticorpo secundário correspondente ao anticorpo primário. No caso do anticorpo policlonal anti-DENV-3, usou-se o anticorpo secundário IgG anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina (Promega), diluído 1:7500. Para aqueles soros que eram IgG positivos (114, 119 e 121), o anticorpo secundário IgG utilizado foi Anti-humano conjugado com fosfatase alcalina (Promega) enquanto que aqueles soros que eram IgM positivos (111, 118, IVA, KAW) foram reagidos com o anticorpo secundário IgM Anti-humano conjugado com fosfatase alcalina (Sigma). As lavagens seguiram o protocolo descrito anteriormente e a revelação era realizada em 10 mL de tampão fosfatase alcalina (AP- buffer) acrescido dos substratos da

enzima, 33 µL de BCIP (50mg/mL, Promega) e 66 µL de NBT (50mg/mL, Promega) por aproximadamente 15 min., ao abrigo da luz.

#### **6.2.15 Teste sorológico tipo ELISA com antígeno recombinante prM/E<sub>Δ100</sub> de DENV-3**

Alguns ensaios imunoenzimáticos preliminares foram realizados com a proteína purificada prM/E<sub>Δ100</sub> de DENV-3. Todos os soros humanos utilizados foram fornecidos pelo LACEN (Laboratório Central).

Inicialmente foi realizado um ELISA indireto, no qual uma placa foi sensibilizada com 100 µL do antígeno recombinante purificado, diluído em 50 mM tampão carbonato/Bicarbonato pH 9.5 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> /NaHCO<sub>3</sub>) para concentrações de 1, 2, 4, 8 e 16 µg/mL. Esta placa foi incubada por 16 horas a 4 °C e em seguida lavada seis vezes com tampão de lavagem composto por 1X PBS/ 0.01% Tween. Posteriormente, era acrescentado o soro humano identificado como 114, coletado em uma fase inicial da doença e positivo para IgG anti-DENV. O soro foi diluído em 1X PBS/ 0.01% Tween/ 2% Leite para concentrações finais de 1:100 e 1:400. Como controle negativo foi utilizado um soro negativo para DENV, também diluído 1:100 e 1:400. Foi aplicado 100 µL do primeiro anticorpo e a placa era incubada a 37 °C por 30 min. A placa era lavada 6 vezes e 100 µL do segundo anticorpo (conjugado) era adicionado, ou IgG Anti-humano (Sigma), diluído 1:500, seguida de incubação a 37 °C por 30 min. A placa era lavada novamente por 6 vezes seguida da adição de 100 µL do substrato/cromógeno da enzima, TMB (TMB *BlueSTOP™* Solution, KPL) e incubação a temperatura ambiente por 10 minutos, sob abrigo da luz. Para interromper a reação, era adicionado 100 µL de ácido sulfúrico (2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A densidade óptica (DO) de cada poço era lida a 450nm.

Em outro ELISA, para titulação do antígeno, dois soros positivos para IgM anti-dengue, identificados como IVA e KAW, foram diluídos em 50 µL de 50 mM tampão carbonato/Bicarbonato pH 9.5 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>) para concentração final de 1:100, em 6 poços cada. Esta placa foi incubada por 16 horas a 4 °C e em seguida lavada seis vezes com tampão de lavagem composto por 1X PBS/ 0.01% Tween. Posteriormente, era acrescentado o antígeno, a proteína recombinante prM/E<sub>Δ100</sub> de DENV-3 nas diluições 1:2, 1:5, 1:10, 1:50 e 1:100 em 50 µL de 1X PBS/ 0.01%

Tween/ 2% Leite e incubado por 30 min a 37 °C. Após lavagem, os poços eram incubados com o anticorpo policlonal anti-DENV3, na diluição 1:500, por 30 min a 37 °C. Uma nova lavagem era realizada e em seguida o último anticorpo, IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase (Sigma), diluído 1:1200, foi aplicado nos poços e a incubação ocorreu por 30 min a 37 °C. A placa era lavada novamente seguida da adição de 100 µL do substrato/cromógeno da enzima, TMB (TMB *BlueSTOP™ Solution*, KPL) e incubação a temperatura ambiente por 10 minutos, sob abrigo da luz. Para interromper a reação, era adicionado 100 µL de ácido sulfúrico (2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A densidade óptica (DO) de cada poço era lida a 450nm.

### **6.3 Metodologias para expressão da protease recombinante em *E. coli***

#### **6.3.1 Reação da Transcriptase Reversa (RT) e PCR**

O RNA viral de VFA foi convertidos a uma cópia complementar de DNA (cDNA), igualmente ao modo de os RNA virais de DENV foram convertidos (tópico 6.2.1). Também foi através de amplificação enzimática utilizando-se o kit *Improm II Reverse Transcriptase* (Promega) e o oligonucleotídeo iniciador *Random Primer* (Invitrogen), sob as mesmas condições e quantidade de tampões. Para amplificação dos genes correspondentes à porção hidrofílica do cofator NS2B (itens 1 e 2 da tabela 6.4) como ao domínio protease da NS3 (itens 3 e 4 da tabela 6.4), 5 µL do cDNA foi usado como molde, 2,7 µL de uma solução de 2,5mM de dNTPs, 2 µL de tampão comercial de reação (10X *High Fidelity Buffer with Mg<sup>2+</sup>*), 2 µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,3 µL da enzima Triple Master (5U/ µL ) e água ultra-pura tratada com DEPC para volume final de 20 µL. A ciclagem pelo qual foi submetida consistiu de um ciclo a 94°C por 3 min e 40 ciclos a 94°C por 30 seg, a 50°C por 30 seg e a 68°C por 1 min. Alíquotas das amostras de DNA amplificadas (1:10) foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% com 0,5 µg/mL de brometo de etídio e os amplicons correspondentes as regiões genômicas determinadas foram purificados utilizando-se o kit *High Pure PCR* (Roche) e recuperados em 50 µL de água ultra-pura. Em seguida, estes produtos purificados foram submetidos novamente a uma PCR, chamada de PCR de fusão pela união do cofator NS2B ao domínio protease da NS3, através do *linker* Gly<sub>4</sub>-Ser-Gly<sub>4</sub>. Sequências que codificam para 4 glicinas, 1 serina e mais 4 glicinas foram desenhadas nas extremidades dos oligonucleotídeos 2 e 3 (tabela 6.4), sendo assim inseridas na região 3' do cofator e

na região 5' da protease por meio da reação de PCR e hibridizadas durante a PCR de fusão, gerando a quimera NS2B/NS3. Portanto, para a PCR de fusão foram usados 1 µL de cada produto de PCR purificado e 2 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (itens 1 e 4 da tabela 6.4), juntamente com os outros reagentes citados previamente no protocolo de reação para PCR. Esta reação foi submetida a um ciclo de 95°C por 3 min e a 40 ciclos de 95°C por 30 seg, 62°C por 30 seg e 68°C por 1 min. Esta amostra de DNA amplificada foi analisada por eletroforese e purificada pelo kit *High Pure PCR* (Roche) e recuperada em 50 µL de água ultra-pura.

**Tabela 6.4. Oligonucleotídeos iniciadores para amplificação da Protease de VFA e oligonucleotídeos presentes no vetor pQE-30 utilizados para o sequenciamento**

OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUENCIA	REGIÃO GENÔMICA*
1. 2BCo +	5' CGGGATCCGATGGGCTAGAGCTCAAG 3'	4335-4355
2. CF40Gly -	5' CCCGCCTCCACCACTACCTCCGCCCCCGTCCCATGGCACTTTCTC 3'	4448-4465
3. NS3proGly +	5' GGGGGCGGAGGTAGTGGTGGAGGCGGGAGTGGGGATGTCTTGTGGGAT 3'	4571-4591
4. NS3pro -	5' CCGGTACCTTTCTTTAGCATTGTCGG 3'	5123-5140
5. NS3 mut +	5' CTATCCAAGTGGCACTGCAGGATCTCCTATTG 3'	4966-4997
6. NS3 mut -	5' CAATAGGAGATCCTGCAGTGCCACTTGGATAG 3'	4966-4997
8. RSR -	5' CATTACTGGATCTATCAA 3'	---
9. RBSF +	5' GAATTCATTAAAGAGG 3'	---

\* Contando a partir do 1º nucleotídeo do genoma de VFA

### 6.3.2 Clonagem da quimera NS2B/NS3 de VFA no vetor pQE-30

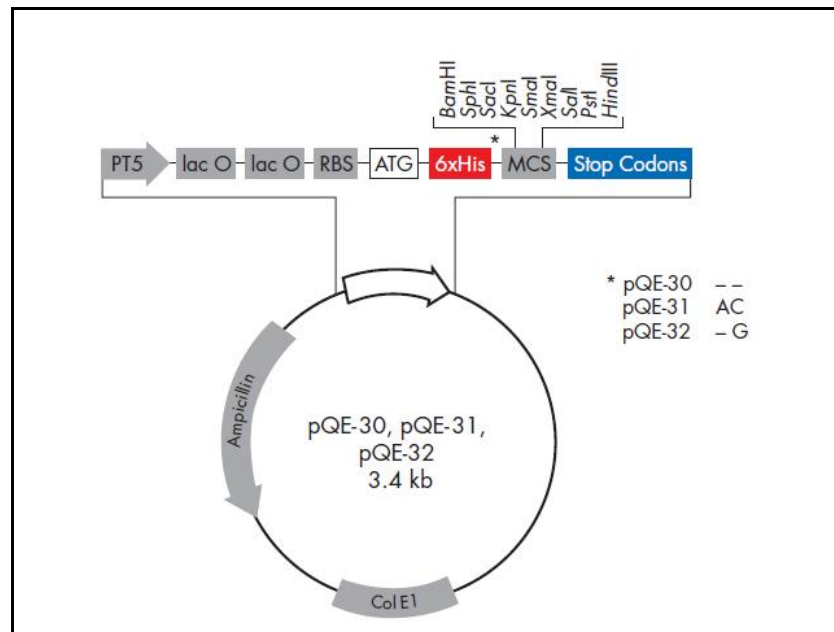
O produto NS2B/NS3 de VFA gerado através de PCR de fusão, assim como o vetor pQE-30 (Qiagen, figura 6.5), foram tratados com as enzimas de restrição BamHI 20U/µL (New England Biolabs) e KpnI 10U/µL (New England Biolabs), de acordo com tampões e condições prescritas pelo fabricante. Posteriormente, estas digestões foram purificadas de acordo com as especificações do kit *High Pure PCR* (Roche) e recuperadas em 50 µL de água ultra-pura. Para reação de ligação do inserto com o vetor pQE-30, as quantidades de DNA do vetor e inserto foram determinadas através de visualização em gel de agarose. Utilizou-se uma relação de 1:3 (vetor:inserto), misturados com 1X de tampão de reação da T4 DNA ligase

(USB), 1U da enzima T4 DNA ligase (USB) e água ultra-pura para um volume final de reação de 20  $\mu\text{L}$ . As reações foram incubadas a 16 °C por 16 horas.

Toda ligação foi usada para transformação de células quimicamente competentes da linhagem TOP10F' de *E. coli* e ocorreu da mesma forma para transformar a linhagem TOP10, descrita no tópico 6.2.4, para clones de DENV. Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  e o volume restante das bactérias transformadas eram semeadas em placas contendo meio e incubadas a 37 °C por 18 horas e em seguida as colônias eram transferidas para uma placa mãe para identificação.

A seleção de clones recombinantes foi pela técnica de palitagem (BARNES, 1977), também descrita no tópico 6.2.5. Após visualização em gel de agarose, as colônias contendo os prováveis clones recombinantes eram inoculadas em 3 mL de meio líquido LB com 100  $\mu\text{g/mL}$  de ampicilina e crescidas a 37 °C por 18 horas sob agitação constante. As culturas crescidas em meio líquido eram sedimentadas por uma breve centrifugação para minipreparação dos plasmídeos com o *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Em seguida, a presença de insertos correspondentes aos genes de interesse nos plasmídeos foi confirmada em gel de agarose após a reação de uma alíquota da minipreparação com enzimas de restrição capazes de liberar o inserto, no caso BamHI e KpnI. Todos os clones positivos foram estocados em glicerol 50% v/v, num volume total de 1mL, a -80 °C e seqüenciados. As minipreparações foram seqüenciadas utilizando os oligonucleotídeos presentes no vetor pQE-30 (itens 8 e 9, tabela 6.4), pela empresa coreana Macrogen.

Dois microlitros da minipreparação dos clones positivos (recombinantes) foram transformados em bactérias M15, cálcio competente nas mesmas condições descritas previamente. A linhagem M15 possui o plasmídeo pREP4, o qual contém o gene que codifica resistência a kanamicina assim como gene que codifica para o repressor *Lac*, permitindo que os genes contidos no plasmídeo pQE-30 sejam expressos apenas na presença de um indutor análogo a lactose, no caso, IPTG. Após choque térmico das bactérias transformadas e sua posterior recuperação, alíquotas de 50  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  e o resto da transformação foram plaqueadas em placas contendo meio LB sólido suplementado com 100  $\mu\text{g/mL}$  de Ampicilina e 25  $\mu\text{g/mL}$  Kanamicina, incubadas a 37 °C por 18 horas. Após a verificação da presença de colônias na placa, era feita uma placa mãe para identificação de cada clone.



**Figura 6.5.** Mapa do vetor pQE-30. FONTE: The Qiaexpressionist, Qiagen

### 6.3.3 Expressão da protease recombinante

A partir de estoques em glicerol das bactérias *E. coli* M15 contendo os plasmídeos recombinantes, foi feito um pré-inóculo de 100 mL de meio líquido contendo LB/Ampicilina/Kanamicina e crescidas a 37 °C por 18 horas sob agitação constante. No dia seguinte, todo volume foi passado para 1L de meio LB suplementado com 100 µg/mL de Ampicilina e 25 µg/mL Kanamicina e incubado a 37°C, 200 r.p.m. até a obtenção de uma OD<sub>600</sub> entre 0,4 e 0,6. Foi adicionado IPTG ao meio de cultura para uma concentração final de 1mM e seguiu-se a indução por 4 horas, a 30 °C, a 200 r.p.m. e sob abrigo da luz. Foi incluído um controle negativo (não induzido), que cresceu sob as mesmas condições, mas sem IPTG. Após esse período, as células eram coletadas por centrifugação a 5000 x g, por meia hora, a 4 °C. O sedimento celular era estocado a -20°C por no mínimo 24 horas.

### 6.3.4 Purificação da protease recombinante

O sedimento celular era ressuspenso com 50 mL de buffer de lise (50mM HEPES, 300mM NaCl, 5% Glicerol, pH 7,5) e sonificado em banho de gelo (5x de 30", potência máxima). Em seguida, a centrifugação a 27000 x g por meia hora separava a fração solúvel (meio extracelular) da fração insolúvel. Testes preliminares mostraram que a proteína estava presente na fração solúvel (dados não mostrados) e assim era iniciada a purificação.

A cromatografia de afinidade à metais era realizada a 4°C, na qual 1mL da resina *Talon Metal Affinity resin* (BD-Biosciences), previamente equilibrada com o mesmo tampão acima sem glicerol, era adicionada a uma coluna e em seguida passado todo volume do meio extracelular. Era estocado o que não se ligava à resina e esta era lavada com 20 mL de buffer de lavagem (50mM HEPES, 300mM NaCl pH 7.5). A eluição da proteína era realizada 4 vezes com 250 µL de tampão de eluição I (50mM HEPES, 300mM de NaCl e 500mM Imidazol pH 7.5) e a esta era adicionado 20% de glicerol, permitindo que a proteína não perdesse atividade. Frações de todas etapas foram analisadas por SDS-PAGE a 13%, os quais foram corados com *Comassie blue*. A identidade das proteínas foi confirmada pela técnica de *Western-blot*, (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). Após coloração da membrana (Hybond C, Amersham) com solução de Ponceau S, as bandas do padrão de peso molecular (Benchmark<sup>TM</sup> Protein Ladder, Invitrogen, ou 6H, Sigma) utilizado eram visualizadas e marcadas com caneta esferográfica. Em seguida, as membranas eram lavadas em com água destilada e saturadas com a solução 1X TBS/5% leite, a temperatura ambiente, por 1 hora. Para a primeira incubação, era utilizado o anticorpo específico contra o vírus VFA, diluído 1:500, ou anticorpo monoclonal dirigido contra a cauda de poli-histidina, diluído 1:3000 (Amersham). Todas diluições eram realizadas em solução 1X TBS/5% leite. Após incubação por 1 hora a 37 °C sob agitação, as membranas eram lavadas três vezes com 1X TBS, por 5 min., a temperatura ambiente. A incubação com o anticorpo secundário anti-mouse (Promega), diluído 1:7500, e as lavagens, seguiram o protocolo descrito anteriormente. A revelação era realizada em 10 mL de tampão fosfatase alcalina (AP-buffer) acrescido dos substratos da enzima, 33 µL de BCIP (50mg/mL, Promega) e 66 µL de NBT (50mg/mL, Promega) por aproximadamente 15 min., ao abrigo da luz.



Alíquotas da proteína recombinante foram enviadas ao Dr. Prof Luiz Juliano, para ensaios de atividade funcional.

### 6.3.5 Mutagênese da protease

A atividade catalítica da protease é formada pela tríade catalítica dos aminoácidos His<sub>53</sub>, Asp<sub>77</sub> e Ser<sub>138</sub> de VFA (CHAMBERS et al., 1990b) e para que possa ser determinada, é necessário que nos testes se exclua a atividade de possíveis proteases bacterianas contaminantes. Para isso, uma protease mutante e inativa é gerada e submetida aos mesmos testes, para comparação de atividade.

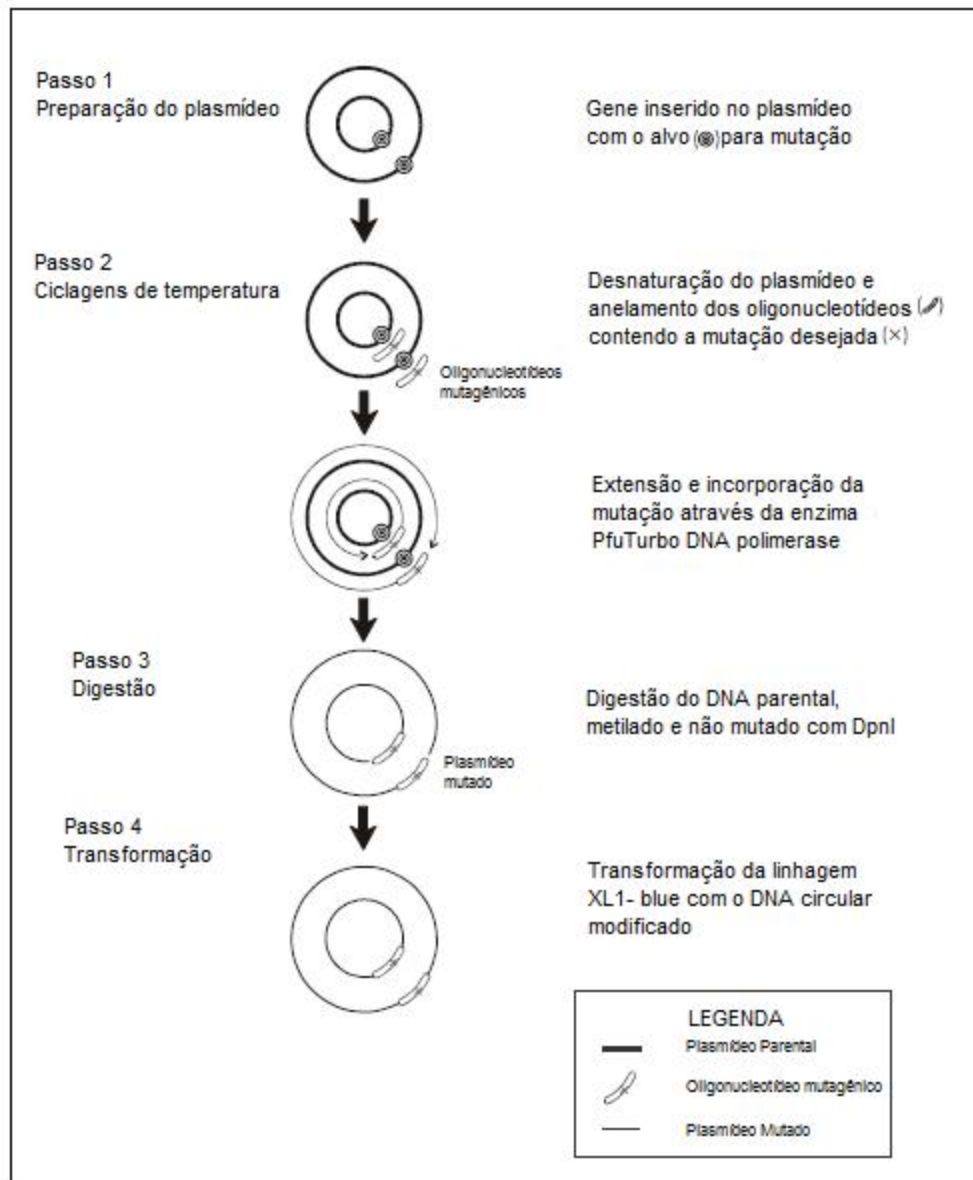
Para construção da proteína mutante, foram desenhados oligonucleotídeos com uma mutação na região da Ser<sub>138</sub> da NS3 (oligonucleotídeos 5 e 6, tabela 6.4) e utilizado um kit de mutagênese (*Quik-Change Site Directed kit*, Stratagene), cujo esquema de utilização está representado na figura 6.6. A mutação é do tipo não sinônima, sendo que, durante a tradução ocorre a substituição do aminoácido serina por uma alanina, gerando a protease não funcional (mutante). Para isso, a minipreparação do clone da protease parental foi usada como *template* para uma reação de PCR mutagênica mutagênico, realizado de acordo com as instruções do manual fornecido pelo fabricante do kit de mutagênese. Para reação, foram utilizados 5 µL de 10x tampão de reação comercial, 50 ng da minipreparação da protease parental, 125 ng de cada oligonucleotídeo, 1 µL da mistura de dNTPs (Stratagene), 1 µL da enzima *PfuTurbo* DNA polimerase (2.5U/µL, Stratagene) e água ultra-pura até completar volume para 50 µL. Esta reação foi submetida a um ciclo a 95 °C por 30 seg e a 16 ciclos a 95 °C por 30 seg, 55 °C por 1 min e a 68 °C por 5 min. Em seguida, toda a amplificação foi submetida a um tratamento com 1 µL da endonuclease DpnI (20U/µL, New England Biolabs) e incubada a 37 °C por 1 hora. A DpnI tem especificidade por DNA metilado, que ocorre em DNA extraído de linhagens de *E. coli*. Assim, a DpnI é utilizada para digerir o *template* parental, selecionando o DNA sintetizado com a mutação.

Após o tratamento com a enzima, 1 µL de reação foi usado para transformar 100 µL da linhagem XL1-blue de bactérias *E. coli* quimio-competentes (descongeladas em banho de gelo). Como controle negativo, 1 µL da minipreparação do clone da protease parental também foi usada para transformar essa mesma linhagem. Estas misturas foram incubadas no gelo por 30 min e depois,

submetidas a um choque térmico a 42 °C por 45 seg, seguido de incubação no gelo por 2 min. As bactérias foram recuperadas pela adição de 500 µL de meio NZY e incubação a 37 °C por uma hora, a 200 r.p.m.. Uma alíquota de 250 µL das bactérias transformadas foram semeadas em placas LB sólido com 100 µg/mL de ampicilina e incubadas a 37 °C por 18 horas. Após a verificação da presença de possíveis colônias recombinantes na placa, era feita uma placa mãe, a qual era incubada novamente a 37 °C por 18 horas. Na etapa seguinte, uma PCR de colônia foi realizada para seleção de clones recombinantes em que o gene da protease era amplificado. Como descrito previamente, era realizada a lise bacteriana e centrifugação, e 1 µL de sobrenadante eram adicionados a 1,5 µL de 10x tampão comercial para reação (Invitrogen), 1,2 µL de 2,5 mM dNTPs, 0,45 µL de 50mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0,075 µL Taq Polimerase (5U/ul, Invitrogen), 1,5 µL dos mesmos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do genes (1 e 4, tabela 6.4) e água ultra-pura para volume final de 50 µL. Como controle positivo, foi usado 1 µL da minipreparação do DNA parental (reação de PCR controle). Esta reação era submetida a 1 ciclo a 95 °C por 3 min e a 40 ciclos a 95 °C por 30 seg, a 53 °C por 30 seg e a 72 °C por 1 min. Alíquotas das amostras de DNA amplificadas (1:10) foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Os produtos de PCR, nos quais a amplificação foi positiva, foram tratados com a endonuclease PstI (20U/µL, New England Biolabs) de acordo com tampões e condições e descritas pelo fabricante, para selecionar aqueles clones que apresentavam o gene da protease mutante. Nos genes em que a mutação foi inserida efetivamente houve a criação de um sítio para a enzima de restrição, ocorrendo assim digestão somente nesses produtos. Como controle negativo, foi usado o produto de PCR controle. Todo volume das digestões foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

As colônias contendo clones recombinantes e o clone parental (controle) eram inoculadas em 3 mL de meio líquido LB com 100 µg/mL de ampicilina e crescidas a 37 °C por 18 horas sob agitação constante. As culturas crescidas em meio líquido eram sedimentadas por uma breve centrifugação para minipreparação dos plasmídeos com o *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Estas minipreparações também foram enviadas para empresa Macrogen na Coreia, para seqüenciamento. Paralelamente, as minipreparações foram usadas para transformar a linhagem M15,

do mesmo modo descrito anteriormente (tópico 6.3.3). Conseqüentemente, as proteases selvagem e mutante foram expressas e purificadas de acordo com os protocolos descritos nos tópico 6.3.4 e enviadas para o Dr. Luiz Juliano da Escola Paulista de Medicina, para análise funcional das mesmas.



**Figura 6.6.** Esquema de mutagênese da protease. FONTE: Adaptado e modificado do manual QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene

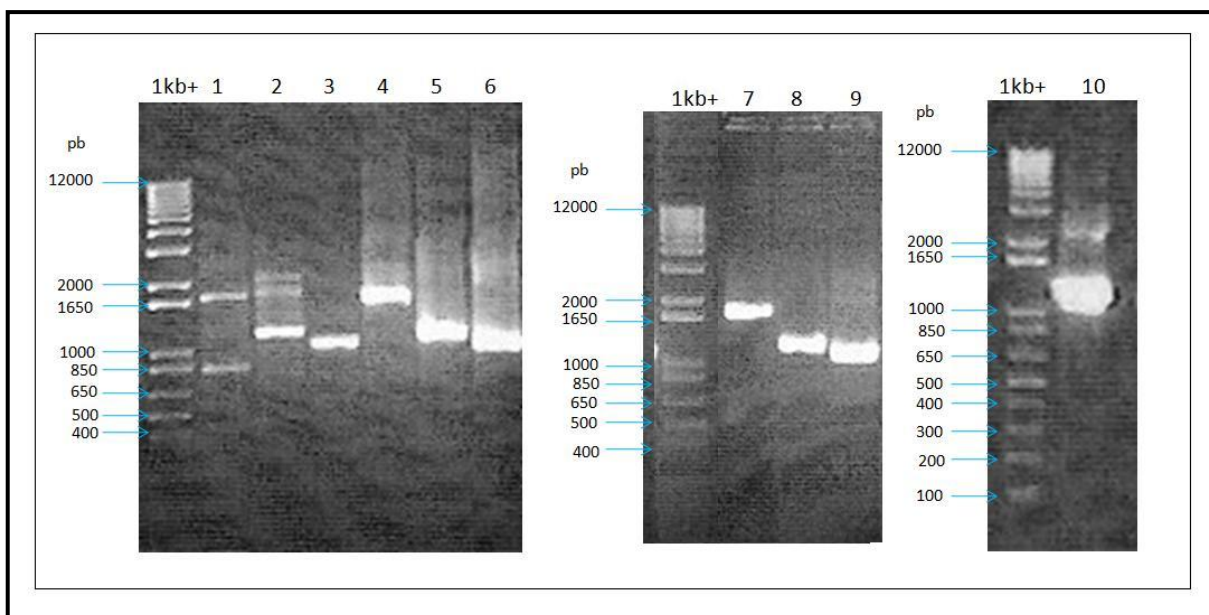
## 7. RESULTADOS DENV

### 7.1. Clonagem dos genes prM/E, E e NS1 de DENV-1, -2, -3 e -4

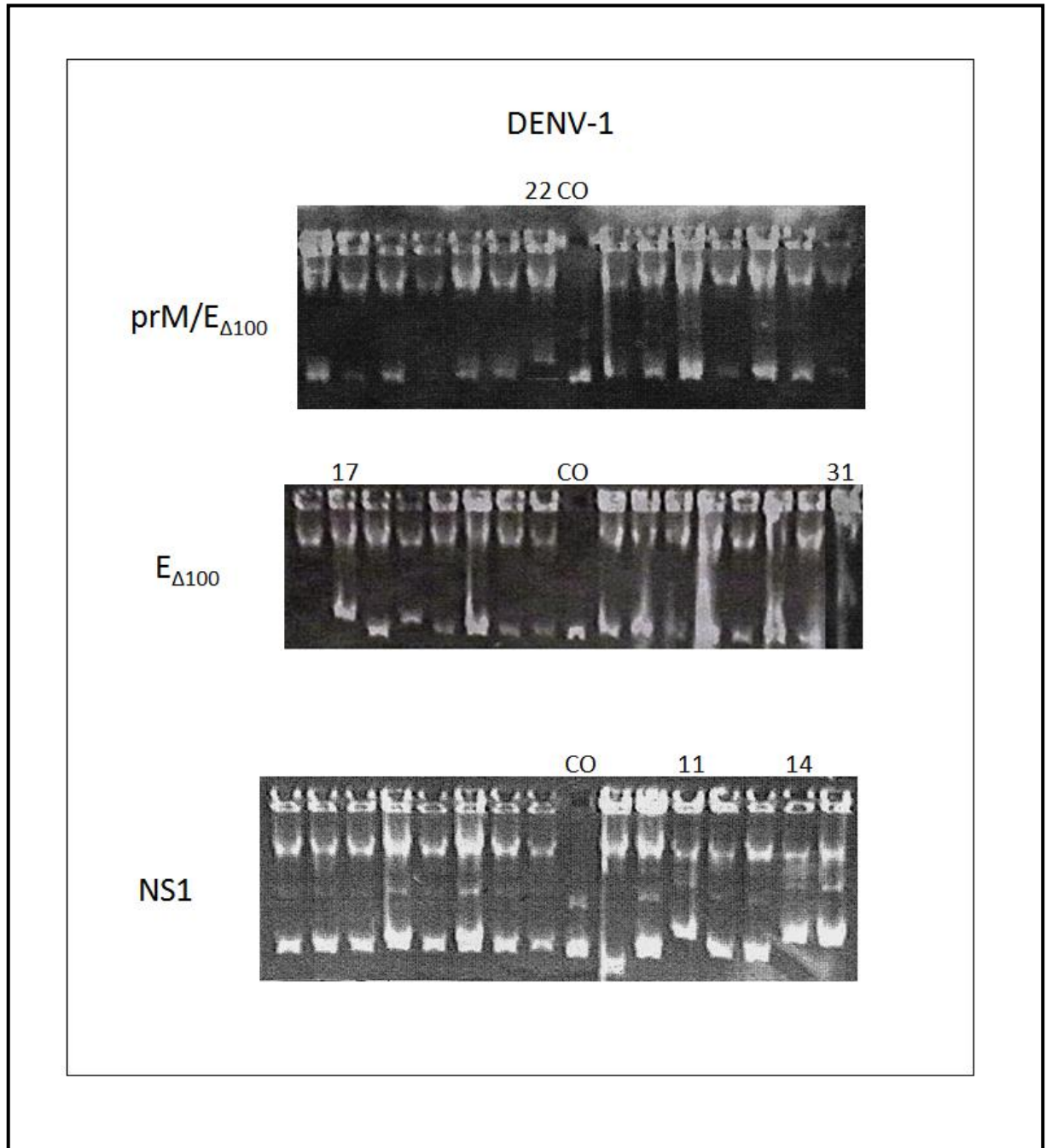
Cepas virais de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4 (tópico 6.1.5) serviram de protótipo para síntese de cópias aleatórias de DNA complementar (cDNA) dos genomas, através da reação de transcrição reversa do RNA viral. Em seguida, através de reações de PCR (utilizando os oligonucleotídeos 1 ao 15, 21 e 22, tabela 6.1, tópico 6.2.2), foram amplificados os genes correspondentes à proteína quimérica pré-membrana e envelope (prM/E<sub>Δ100</sub>), Envelope (E<sub>Δ100</sub>) e não-estrutural 1 (NS1), dos quatro sorotipos, com exceção de DENV-4, em que somente a E<sub>Δ100</sub> foi amplificada. A figura 7.1 representa o perfil eletroforético destas amplificações, na qual os produtos (1 ao 10, referentes à tabela 6.2, tópico 6.2.2) prM/E<sub>Δ100</sub>, E<sub>Δ100</sub> e NS1 apresentam a massa molecular esperada, de aproximadamente 1690, 1190 e 1055 pares de bases, respectivamente.

Após a purificação, os fragmentos de DNA resultantes das reações de PCR, foram submetidos a digestão com endonucleases de restrição, re-purificados e ligados ao plasmídeo pMT/BiP/V5-His A (tópico 6.2.3), digerido com as mesmas endonucleases e também re-purificado. Para a clonagem dos genes correspondentes as proteínas prM/E<sub>Δ100</sub> e E<sub>Δ100</sub> de DENV-1, as amostras foram tratadas com as enzimas de restrição BglII e XhoI, enquanto para clonagem do DNA correspondente a proteína prM/E<sub>Δ100</sub> de DENV-2, o produto da PCR e o vetor foram tratados pelas enzimas SmaI e XbaI. Para a clonagem dos genes restantes, como prM/E<sub>Δ100</sub> de DENV-3, E<sub>Δ100</sub> de DENV-2, -3 e -4, NS1 de DENV-1, -2 e -3, as amostras foram clivadas pelas endonucleases de restrição BglII e XbaI. As reações de ligação foram transformadas utilizando-se a linhagem bacteriana cálcio competente TOP10 (tópico 6.2.4). Em seguida, foi realizada a técnica de palitagem para detecção de plasmídeos recombinantes (tópico 6.2.5). As figuras 7.2, 7.3, 7.4 e 7.5 mostram o perfil eletroforético da análise dos plasmídeos recombinantes com os genes clonados de DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, respectivamente, em pMT/BiP/V5-His A. Pela diferença de peso molecular, quando comparadas com o controle (plasmídeo sem inserto), as colônias identificadas indicaram a provável presença de plasmídeos recombinantes. Os clones escolhidos foram inoculados em meio de cultura líquido, contendo ampicilina para posterior extração do DNA

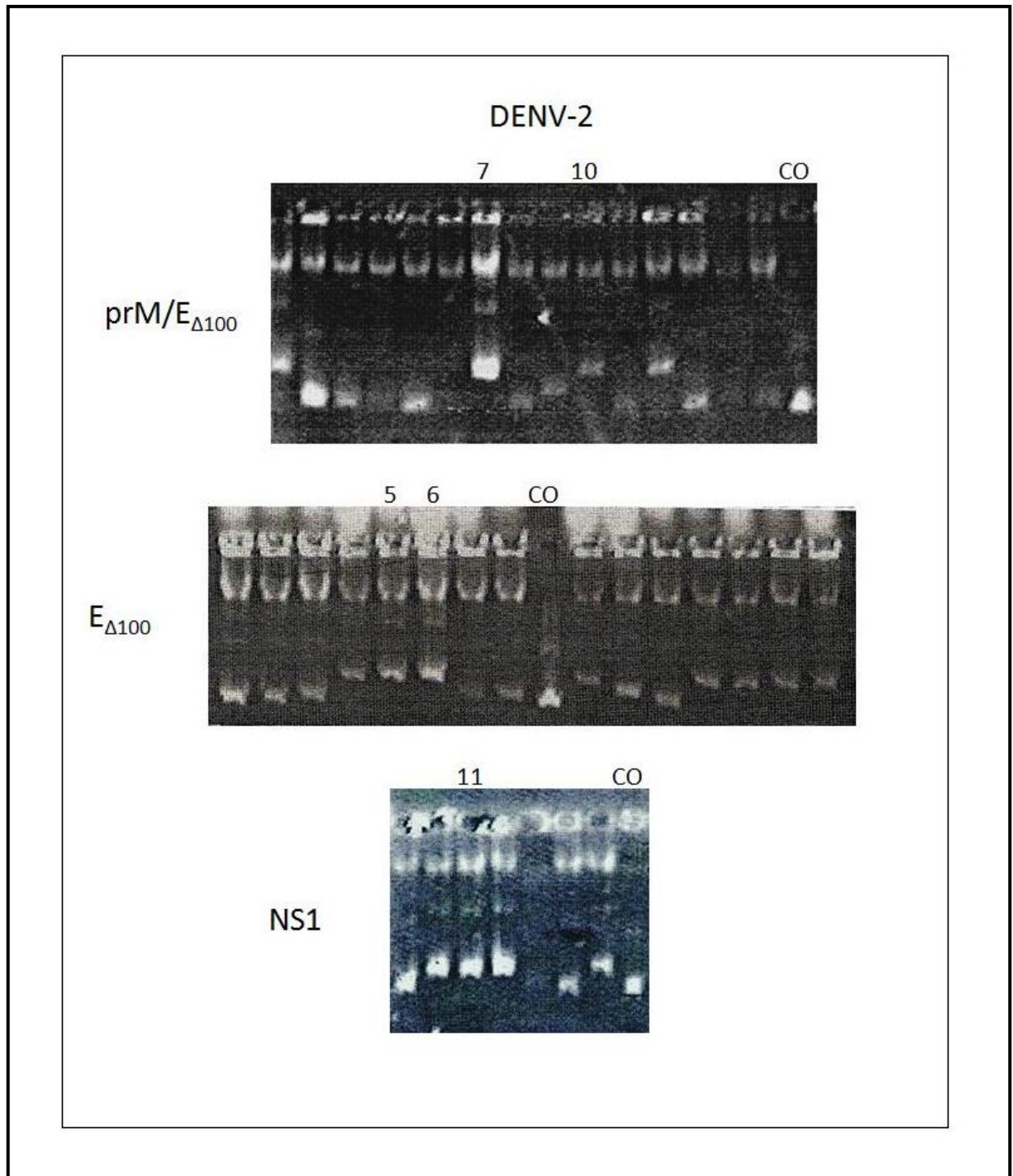
plasmidial, através da minipreparação. Depois de purificados, os plasmídeos foram digeridos com as mesmas endonucleases de restrição utilizadas para clonagem para verificação do correto tamanho dos insertos (Figura 7.6), sendo que somente o clone prM/E $\Delta_{100}$  de DENV-1 não foi positivo. Até o presente momento não foi obtido nenhum outro clone para esta proteína.



**Figura 7.1.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação dos genes prM/E $\Delta_{100}$  e NS1 (de DENV-1, -2 e -3) e E $\Delta_{100}$  de DENV-1, -2, -3 e -4. **1kb+.** Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder; **1.** DENV-1 prM/E $\Delta_{100}$ ; **2.** DENV-1 E $\Delta_{100}$ ; **3.** DENV-1 NS1; **4.** DENV-2 prM/E $\Delta_{100}$ ; **5.** DENV-2 E $\Delta_{100}$ ; **6.** DENV-2 NS1; **7.** DENV-3 prM/E $\Delta_{100}$ ; **8.** DENV-3 E $\Delta_{100}$ ; **9.** DENV-3 NS1; **10.** DENV-4 E $\Delta_{100}$ .

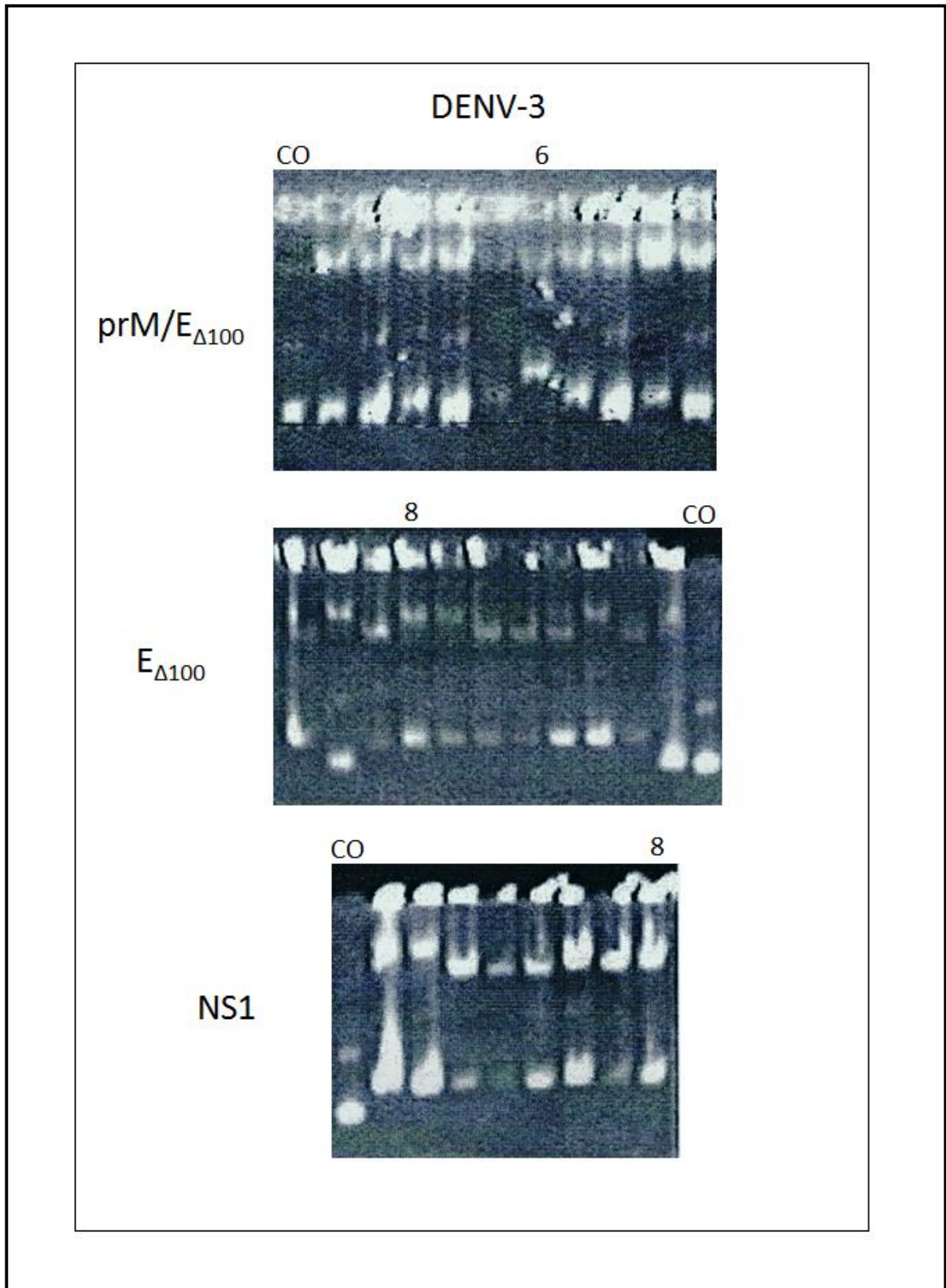


**Figura 7.2.** Eletroforeses em géis de agarose a 0,8% para detecção de plasmídeos recombinantes prM/E $\Delta_{100}$ , E $\Delta_{100}$  ou NS1 de DENV-1. **CO.** Plasmídeo sem inserto como controle negativo; **22.** Colônia com provável presença de plasmídeo recombinante da quimera prM/E $\Delta_{100}$ ; **17 e 31.** Colônias com provável presença de plasmídeo recombinante E $\Delta_{100}$ ; **11 e 14.** Colônias com provável presença de plasmídeo recombinante NS1 selecionadas.



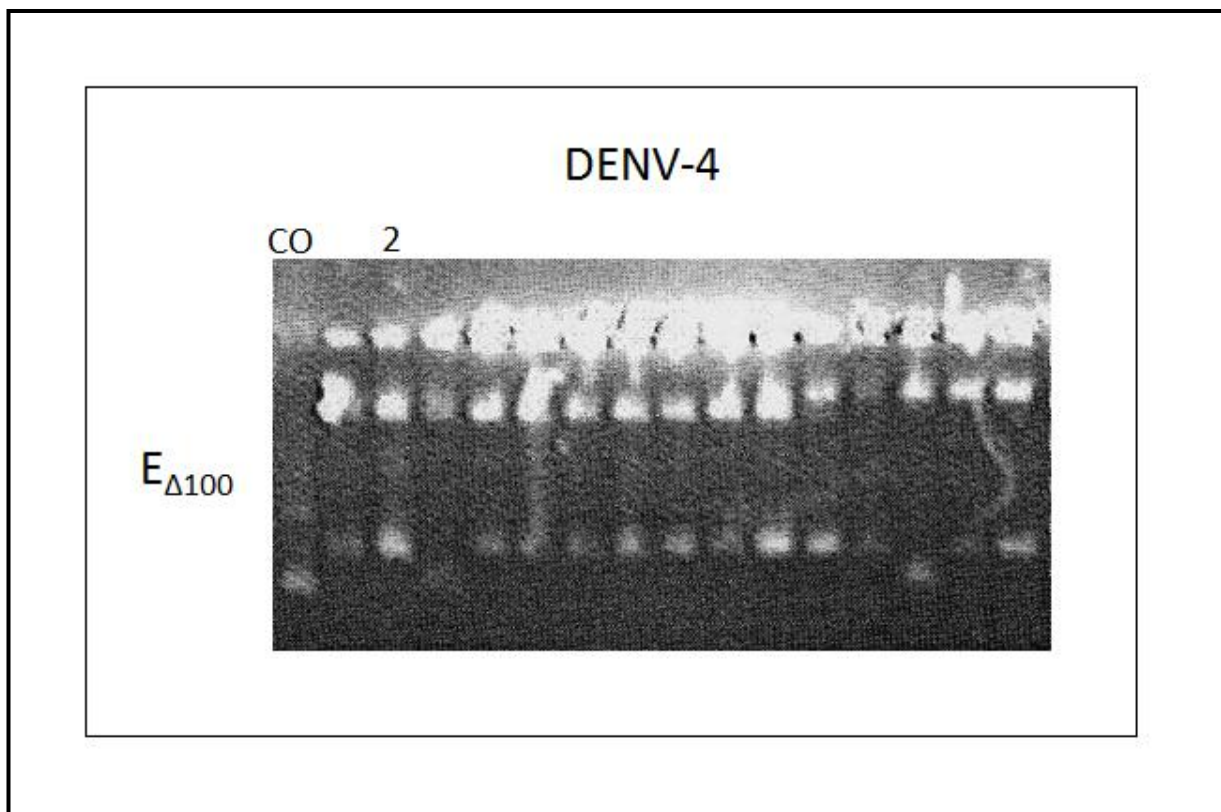
**Figura 7.3.** Eletroforeses em géis de agarose a 0,8% para detecção de plasmídeos recombinantes prM/E $\Delta$ 100, E $\Delta$ 100 ou NS1 de DENV-2. **CO.** Plasmídeo sem inserto como controle negativo; **7 e 10.** Colônias com provável presença de plasmídeo recombinante da químera prM/E $\Delta$ 100; **5 e 6.** Colônias com provável presença de plasmídeo recombinante E $\Delta$ 100; **11.** Colônia com provável presença de plasmídeo recombinante NS1 selecionada.



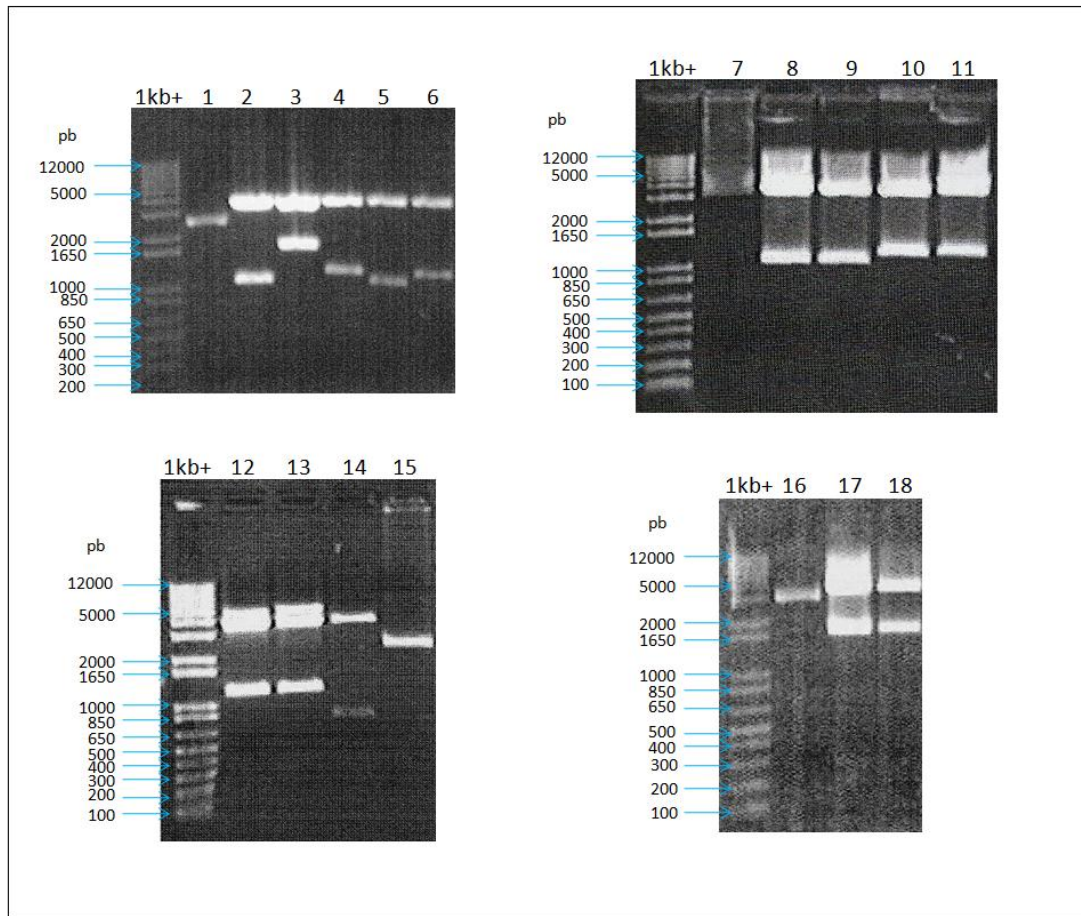


**Figura 7.4.** Eletroforeses em gel de agarose a 0,8% para detecção de plasmídeos recombinantes prM/E<sub>Δ100</sub>, E<sub>Δ100</sub> ou NS1 de DENV-3. **CO.** Plasmídeo sem inserto como controle negativo; **6.** Colônia com provável presença de plasmídeo recombinante da quimera prM/E<sub>Δ100</sub>; **8.** Colônia com provável presença de plasmídeo recombinante E<sub>Δ100</sub>; **8.** Colônia com provável presença de plasmídeo recombinante NS1 selecionada.



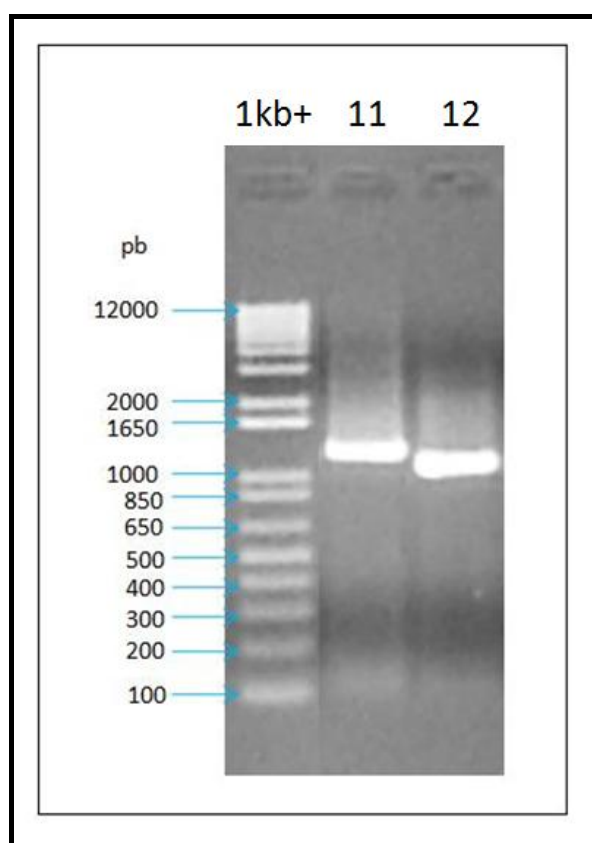


**Figura 7.5.** Eletroforese em gel de agarose a 0.8% para detecção de plasmídeo recombinante E<sub>Δ100</sub> de DENV-4. **CO.** Plasmídeo sem inserto como controle negativo; **2.** Colônia com provável presença de plasmídeo recombinante E<sub>Δ100</sub> selecionada.



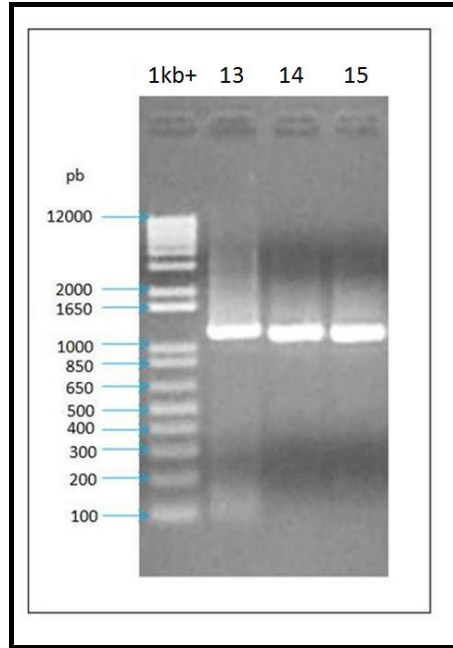
**Figura 7.6.** Eletroforeses em gel de agarose a 0,8% para confirmação dos possíveis clones de DENV-1, -2, -3 e -4. **1kb+.** Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA *ladder*, **1, 7, 15 e 16.** Controle negativo do plasmídeo pMT/BiP/V5-His A. **2.** DENV-2 NS1 clone 11; **3.** DENV-3 prM/E<sub>Δ100</sub> clone 6; **4.** DENV-3 E<sub>Δ100</sub> clone 8; **5.** DENV-3 NS1 clone 8; **6.** DENV-4 E<sub>Δ100</sub> clone 2; **8.** DENV-1 NS1 clone 11; **9.** DENV-1 NS1 clone 14; **10.** DENV-2 E<sub>Δ100</sub> clone 5; **11.** DENV-2 E<sub>Δ100</sub> clone 6; **12.** DENV-1 E<sub>Δ100</sub> clone 17; **13.** DENV-1 E<sub>Δ100</sub> clone 31; **14.** DENV-1 prM/E<sub>Δ100</sub> clone 22 (não é clone); **17.** DENV-2 prM/E<sub>Δ100</sub> clone 7; **18.** DENV-2 prM/E<sub>Δ100</sub> clone 10.

Outras três estratégias de clonagem foram desenhadas para a amplificação do DNA, através de reações de PCR visando uma melhor expressão das proteínas, dos genes correspondentes à  $E_{\Delta 100}$  e NS1 de DENV-3. Em uma das estratégias, foram introduzidas a sequência nucleotídica correspondente a seis códons de histidina, 6xHis seguida de dois códons de término de tradução nos oligonucleotídeos negativos usados nas reações de PCR (itens 17 e 20, tabela 6.1, tópico 6.2.2). Assim, quando clonados no vetor pMT/BiP/V5-His A e expressos, as proteínas não apresentariam os epítomos V5 e 6xHis situados na região carboxi-terminal do plasmídeo. Os amplicons  $E_{\Delta 100}^{c/STOP}$  e  $NS1^{c/STOP}$ , referentes aos itens 11 e 12 da tabela 6.2 (tópico 6.2.2) estão representados pelo perfil eletroforético da figura 7.7, e apresentam a massa molecular esperada, de 1185 e 1055 pares de bases, respectivamente.

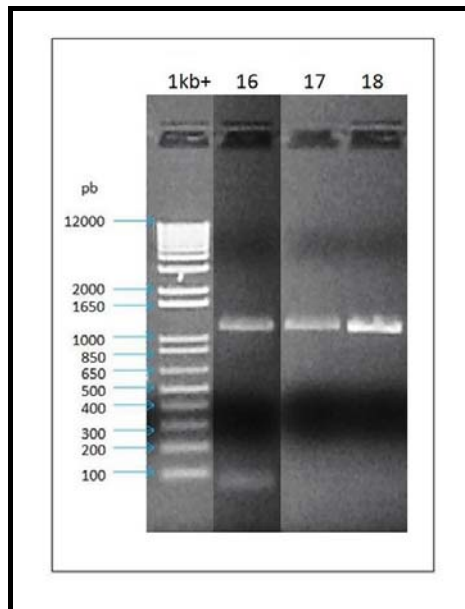


**Figura 7.7.** Perfil eletroforético em gel de agarose a 0,8% da amplificação dos genes  $E_{\Delta 100}^{c/STOP}$  e  $NS1^{c/STOP}$  de DENV-3. **1kb+.** Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder, **11.**  $E_{\Delta 100}^{c/STOP}$ ; **12.**  $NS1^{c/STOP}$ .

Para clonagem de  $E\Delta_{100}$ , ssNS1 e lsNS1 de DENV-3, nos plasmídeos pMT/ V5-His A e pMT/V5-His-TOPO foram seguidas as outras duas estratégias. Para clonagem, em pMT/V5-His-TOPO a presença de uma sequência de Kozak CAAC seguida de um códon de iniciação ATG, eram essenciais nos oligonucleotídeos positivos usados nas reações de PCR (itens 16, 18 e 19, tabela 6.1, tópico 6.2.2). Para a clonagem no vetor pMT/V5-His A eram necessários sítios para enzimas de restrição tanto nos oligonucleotídeos positivos como negativos. Em alguns oligonucleotídeos negativos para clonagem tanto em pMT/ V5-His A como pMT/V5-His-TOPO, a presença de códons de parada de tradução (itens 17 e 20, tabela 6.1, tópico 6.2.2) foi outra alternativa. Além disso, os vetores permitem a inserção de sequências sinais nativas, sendo que para NS1 foram inseridas duas prováveis sequências, localizadas na extremidade carboxi-terminal da E. Uma sequência sinal curta, com 63 nucleotídeos à montante do gene de NS1(ss) e outra, longa, com 84 nucleotídeos à montante do gene de NS1 (ls) (itens 18 e 19 tabela 6.1, tópico 6.2.2). Os fragmentos de DNA  $E\Delta_{100}^{c/ STOP}$ , lsNS1  $^{c/ STOP}$  e ssNS1  $^{c/ STOP}$  (referentes aos amplicons 13, 14 e 15 da tabela 6.2, tópico 6.2.2), os quais apresentam códons de término de tradução e cauda 6xHis, foram amplificados e apresentam a massa molecular esperada, de 1185, 1133 e 1118 pares de bases, respectivamente (Figura 7.8). Os produtos de PCR,  $E\Delta_{100}^{s/ STOP}$ , lsNS1  $^{s/ STOP}$  e ssNS1  $^{s/ STOP}$ , representados pelo perfil eletroforético mostrado na figura 7.9, são referentes aos amplicons em que foram mantidas as etiquetas V5 e His (referente aos itens 16, 17 e 18 da tabela 6.2, tópico 6.2.2). Todos apresentam a massa molecular esperada, de 1185, 1133 e 1118 pares de bases, respectivamente.



**Figura 7.8.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação dos genes  $E\Delta_{100}^{c/STOP}$ ,  $IsNS1^{c/STOP}$  e  $ssNS1^{c/STOP}$  de DENV-3. **1kb+**. Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA *ladder*, **13.**  $E_{\Delta 100}^{c/STOP}$ , **14.**  $IsNS1^{c/STOP}$ , **15.**  $ssNS1^{c/STOP}$ .



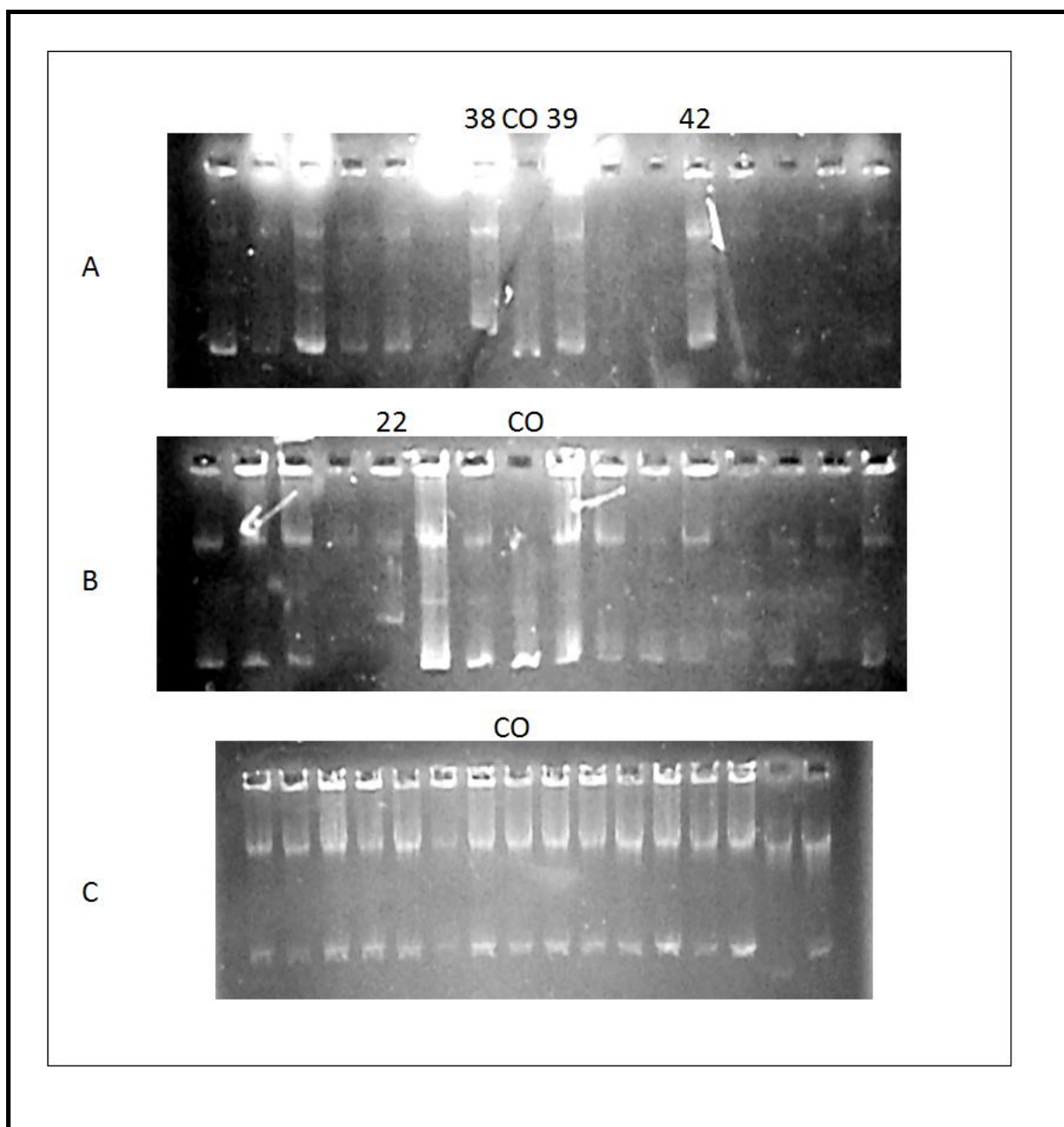
**Figura 7.9.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação dos genes  $E\Delta_{100}^{s/STOP}$ ,  $IsNS1^{s/STOP}$  e  $ssNS1^{s/STOP}$  de DENV-3. **1kb+**. Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA *ladder*, **16.**  $E_{\Delta 100}^{s/STOP}$ , **17.**  $IsNS1^{s/STOP}$ , **18.**  $ssNS1^{s/STOP}$ .

Após a purificação, os produtos das reações de PCR relativos às estratégias alternativas foram submetidos à digestão com endonucleases de restrição. A amostra denominada 11 (Figura 7.7) foi clivado pelas endonucleases de restrição BglII e XbaI, re-purificada e ligada ao plasmídeo pMT/BiP/V5-His A, digerido com as mesmas endonucleases. Para clonagem dos fragmentos de DNA provenientes das reações de PCR denominadas 13 e 16 (Figuras 7.8 e 7.9, respectivamente) em pMT/V5-His A, estes foram purificados e em seguida tratados com as enzimas de restrição SpeI e XbaI, também utilizadas para digerir o vetor. Ressaltando que as amostras 12 (Figura 7.7), juntamente com a 14 e 15 e 17 e 18 (Figuras 7.8 e 7.9, respectivamente), correspondentes ao gene que codifica a proteína NS1, ainda não foram clonadas em pMT/BiP/V5-His e pMT/V5-His, respectivamente. Para a obtenção dos plasmídeos recombinantes das amostras numeradas de 13 a 18 (Figuras 7.7, 7.8 e 7.9) em pMT/V5-His A-TOPO não foi necessário o tratamento com enzimas de restrição, sendo os fragmentos de DNA originados pelas reações de PCR diretamente inseridos no vetor. Todas as reações de ligação foram transformadas na linhagem bacteriana cálcio-competente TOP10 (tópico 6.2.4). Como anteriormente, foi utilizada a técnica de palitagem para detecção de plasmídeos recombinantes ou a técnica de PCR de colônia, nos casos em que não era possível a diferenciação através do peso molecular, ou seja, clonagens realizadas com o plasmídeo pMT/V5-His A-TOPO.

A figura 7.10 mostra o perfil eletroforético da análise de colônias bacterianas transformadas com o plasmídeo pMT/BiP/V5-His contendo o gene  $E_{\Delta 100}^{c/STOP}$  (A) e colônias transformadas com plasmídeos pMT/V5-His com genes  $E_{\Delta 100}^{c/STOP}$  ou  $E_{\Delta 100}^{s/STOP}$  (B e C, respectivamente). Pela diferença de peso molecular, quando comparadas com o controle (plasmídeo sem inserto), as colônias identificadas como 38, 39, 42 e 22 indicaram a provável presença de plasmídeos recombinantes. Os clones escolhidos foram inoculados em meio LB líquido, contendo ampicilina para posterior extração do DNA plasmidial, através da minipreparação. Depois de purificados, os plasmídeos foram digeridos com as mesmas endonucleases de restrição utilizadas para clonagem para verificação do correto tamanho dos insertos (Figura 7.11). Somente as colônias 38 e 22 foram confirmadas como clones recombinantes.

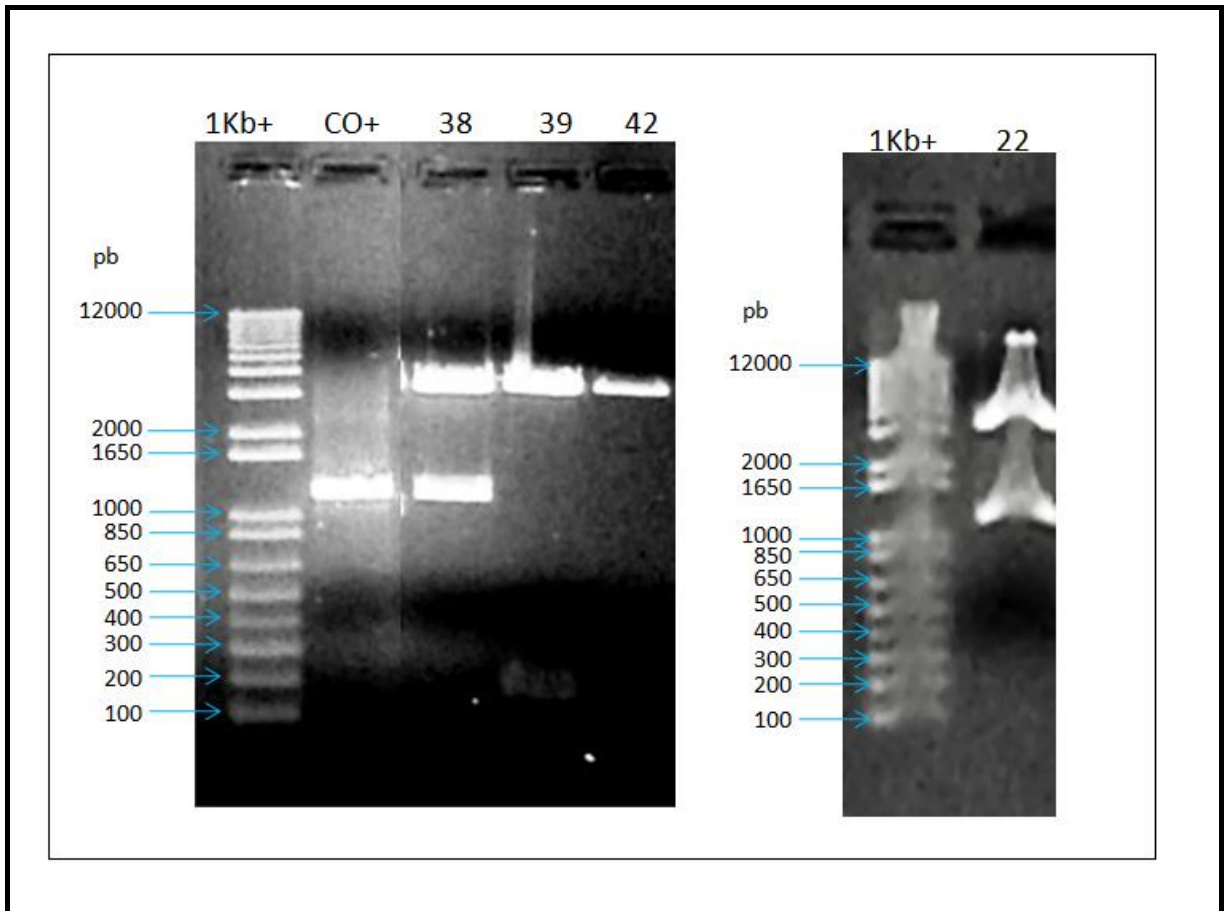
Através de PCR de colônia, foi possível identificar colônias que continham o plasmídeo recombinante pMT/V5-His A-TOPO com os genes  $E_{\Delta 100}^{c/STOP}$ ,  $IsNS1^{c/}$

$STOP$  e ssNS1<sup>c/STOP</sup> (figura 7.12) ou  $E_{\Delta 100}^{s/STOP}$ , IsNS1<sup>s/STOP</sup> e ssNS1<sup>s/STOP</sup> (Figura 7.13). As colônias identificadas como 31, 35, 27, 17, 19, 13, 14, 9, 11, 3 e 6 foram inoculados em meio líquido contendo ampicilina para posterior extração do DNA plasmidial, através da minipreparação.

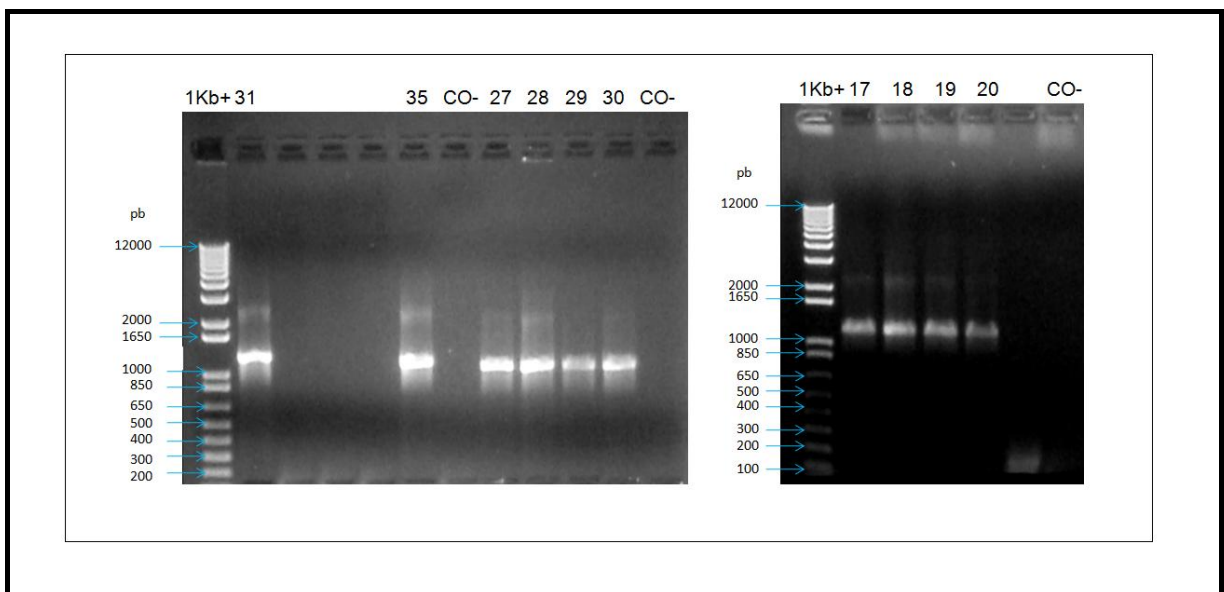


**Figura 7.10.** Eletroforeses em géis de agarose a 0,8% para detecção de plasmídeos recombinantes  $E_{\Delta 100}$  de DENV-3. **A.** Colônias transformadas com plasmídeos pMT/BiP/V5-His com gene  $E_{\Delta 100}^{c/STOP}$ ; **B.** Colônias transformadas com plasmídeos pMT/V5-His com gene  $E_{\Delta 100}^{c/STOP}$ ; **C.** Colônias transformadas com plasmídeos pMT/V5-His com gene  $E_{\Delta 100}^{s/STOP}$ . **CO.** Plasmídeo sem inserto como controle negativo; **38, 39 e 42.** Colônias com provável presença de plasmídeo pMT/BiP/V5-His recombinante com gene  $E_{\Delta 100}^{c/STOP}$ ; **22.** Colônia com provável presença de plasmídeo pMT/V5-His recombinante  $E_{\Delta 100}^{c/STOP}$ .



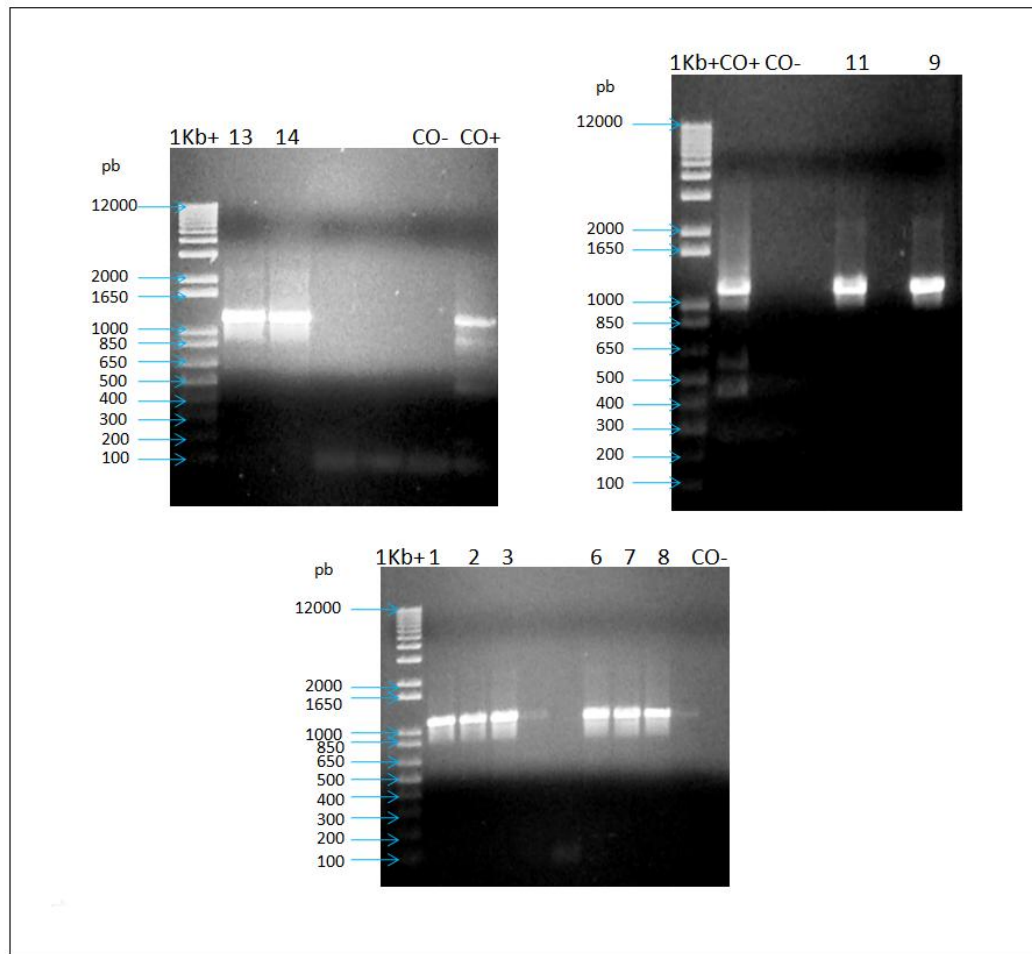


**Figura 7.11.** Eletroforeses em gel de agarose 0,8% para confirmação dos possíveis clones 38, 39, 42 e 22 de DENV-3. **1kb+**. Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA *ladder*, **CO+**. Controle positivo do gene  $E_{\Delta 100}$ ; **38, 39 e 42**. DENV-3  $E_{\Delta 100}^{c/STOP}$  em pMT/BiP/V5-His, somente clone 38 é positivo; **22**. DENV-3  $E_{\Delta 100}^{c/STOP}$  em pMT/V5-His clone 22.



**Figura 7.12.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação por PCR de colônia dos genes  $E_{\Delta 100}^{c/STOP}$ ,  $IsNS1^{c/STOP}$  e  $ssNS1^{c/STOP}$  de DENV-3. **1kb+**. Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA *ladder*, **CO-**. Controle negativo para amplificação; **31 e 35**.  $E_{\Delta 100}^{c/STOP}$ ; **27, 28, 29, 30**.  $IsNS1^{c/STOP}$ ; **17, 18, 19, 20**.  $ssNS1^{c/STOP}$ .





**Figura 7.13.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação por PCR de colônia dos genes  $E\Delta_{100}^{s/STOP}$ ,  $IsNS1^{s/STOP}$  e  $ssNS1^{s/STOP}$  de DENV-3. **1kb+**. Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA *ladder*; **CO-**. Controle negativo por amplificação; **CO+**. Controle positivo para amplificação dos genes  $E\Delta_{100}^{s/STOP}$  e  $IsNS1^{s/STOP}$ , respectivamente ; **13 e 14.**  $E\Delta_{100}^{s/STOP}$ ; **9 e 11.**  $IsNS1^{s/STOP}$ ; **1, 2, 3, 6, 7, 8.**  $ssNS1^{s/STOP}$ .

As minipreparações de plasmídeos de todas as colônias selecionadas como positivas provenientes das diversas estratégias abordadas, foram sequenciadas. Alguns clones ficaram fora de fase de leitura, sendo, portanto, descartados. A tabela 7.1 demonstra o total de clones obtidos, em fase de leitura correta.

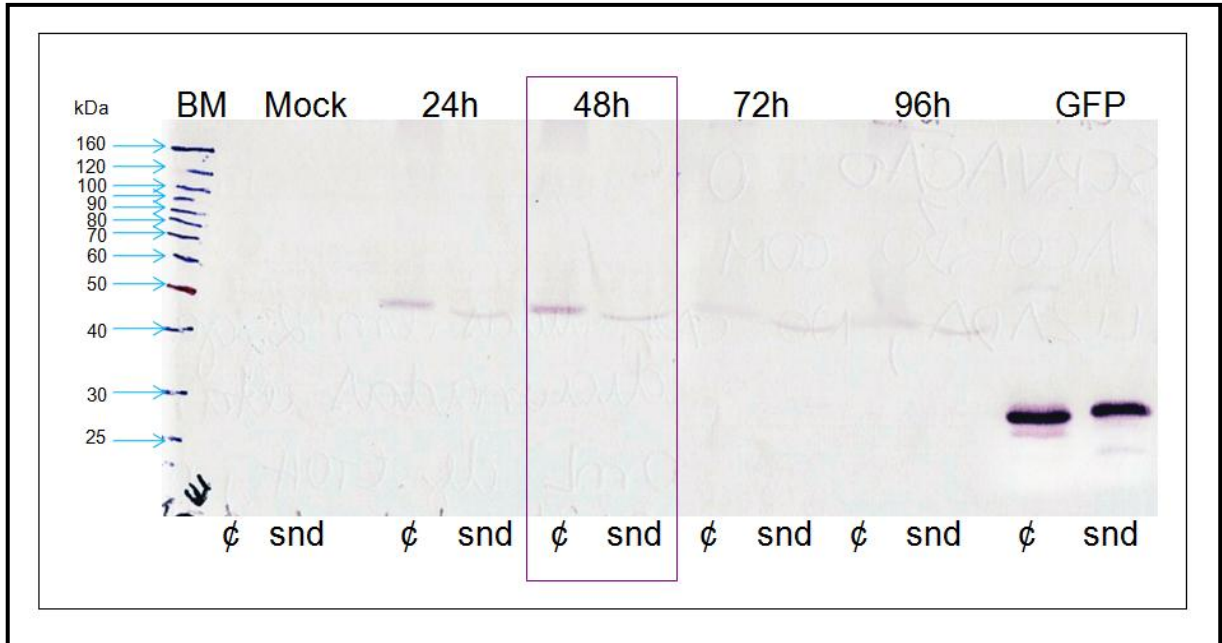
**Tabela 7.1. Total de clones em fase de leitura obtidos**

<b>Proteínas</b>	<b>DENV-1</b>	<b>DENV-2</b>	<b>DENV-3</b>	<b>DENV-4</b>
prM/ E <sub>Δ100</sub>	Não obtido	Clone 7 e 10	Clone 6	---
E <sub>Δ100</sub>	Clone 17	Clone 5 e 6	Clone 8	Clone 2
E <sub>Δ100</sub> <sup>cSTOP</sup>	---	---	Clone 38	---
NS1	Clone 11 e 14	Clone 11	Clone 8	---
ssNS1 <sup>cSTOP</sup>	---	---	Clone 17*	---

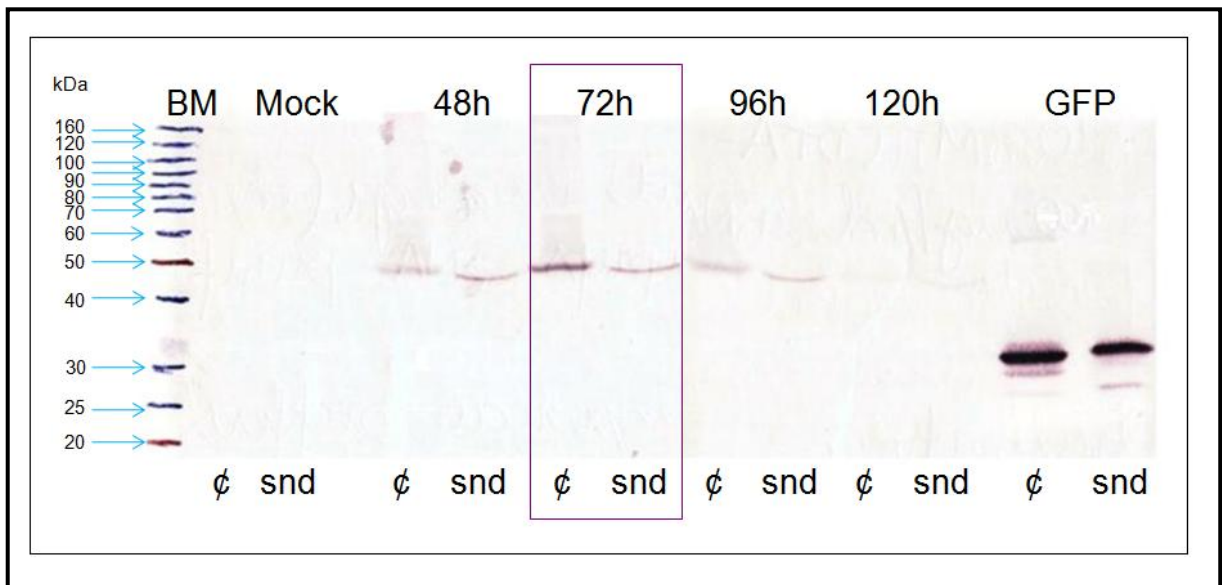
\* Com exceção de DENV-3 ssNS1<sup>cSTOP</sup> 17 (clonagem em pMT/V5-His- TOPO), todos clones foram obtidos utilizando o plasmídeo pMT/BiP/V5-His.

## **7.2 Padronização e expressão de proteínas recombinantes através da transfecção em células de *Drosophila***

O passo seguinte foi inocular novamente as colônias contendo os clones recombinantes para obtenção de uma maior quantidade de DNA plasmidial, através da preparação em escala média, para ser utilizado em ensaios de transfecção em células S2 e teste da expressão de proteínas, conforme descrito no tópico 6.2.7. Em uma primeira etapa, foi realizada uma cinética, para se determinar o tempo ideal de indução, utilizando-se para isto o clone da proteína E<sub>Δ100</sub> 2 do DENV-4. Foram realizadas induções nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas após a transfecção, e o recolhimento da cultura (células e sobrenadantes) foi feito 96 horas após a indução. Pela técnica de *Western-Blot*, utilizando o anticorpo contra o *tag* V5, verificou-se que o tempo ótimo para a indução da expressão protéica na cultura era de 48h após a transfecção (Figura 7.14). Concomitante a esse experimento, foi realizado uma cinética para determinar o tempo ótimo de recolhimento da cultura (48, 72, 96 e 120 horas após a indução). O tempo que apresentou máxima expressão foi de 72 horas (Figura 7.15).

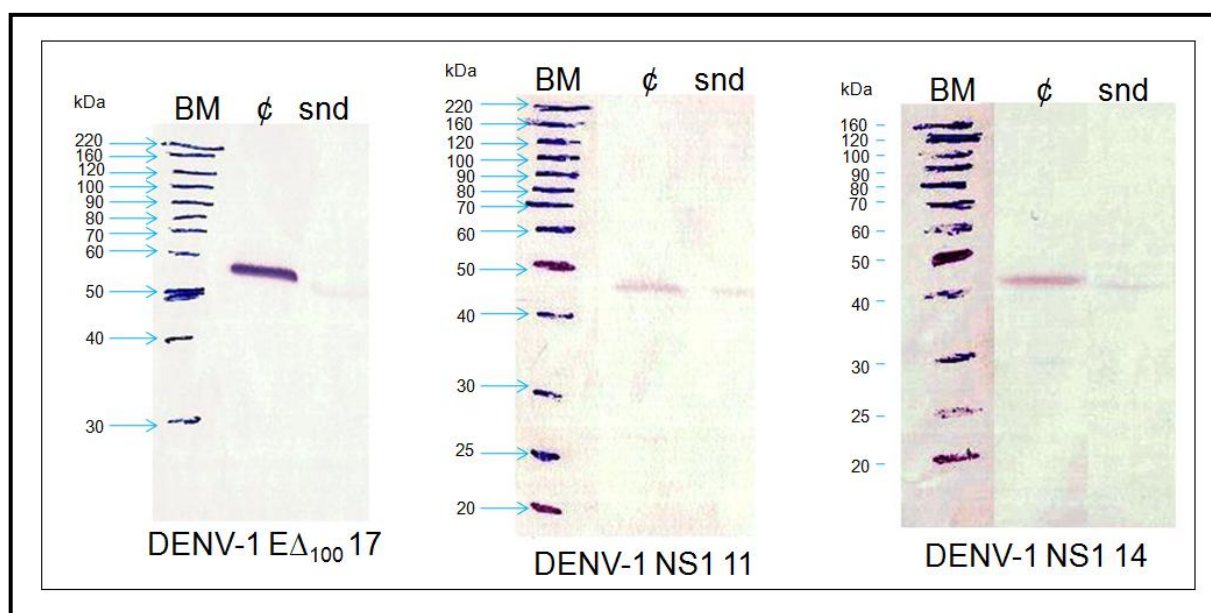


**Figura 7.14.** *Western-Blot* imunomarcado com anticorpo anti-V5 e anticorpo secundário anti-camundongo, conjugado com fosfatase alcalina. Os resultados demonstram a expressão da proteína EΔ<sub>100</sub> de DENV-4, nas células (ϕ) e nos meios extracelulares (snd) nos ensaios de cinética de indução. A indução foi realizada 24h, 48h, 72h e 96h após a transfecção. **BM.** *BenchMark protein ladder*, marcador de peso molecular **Mock.** Controle negativo; **GFP.** Controle Positivo.

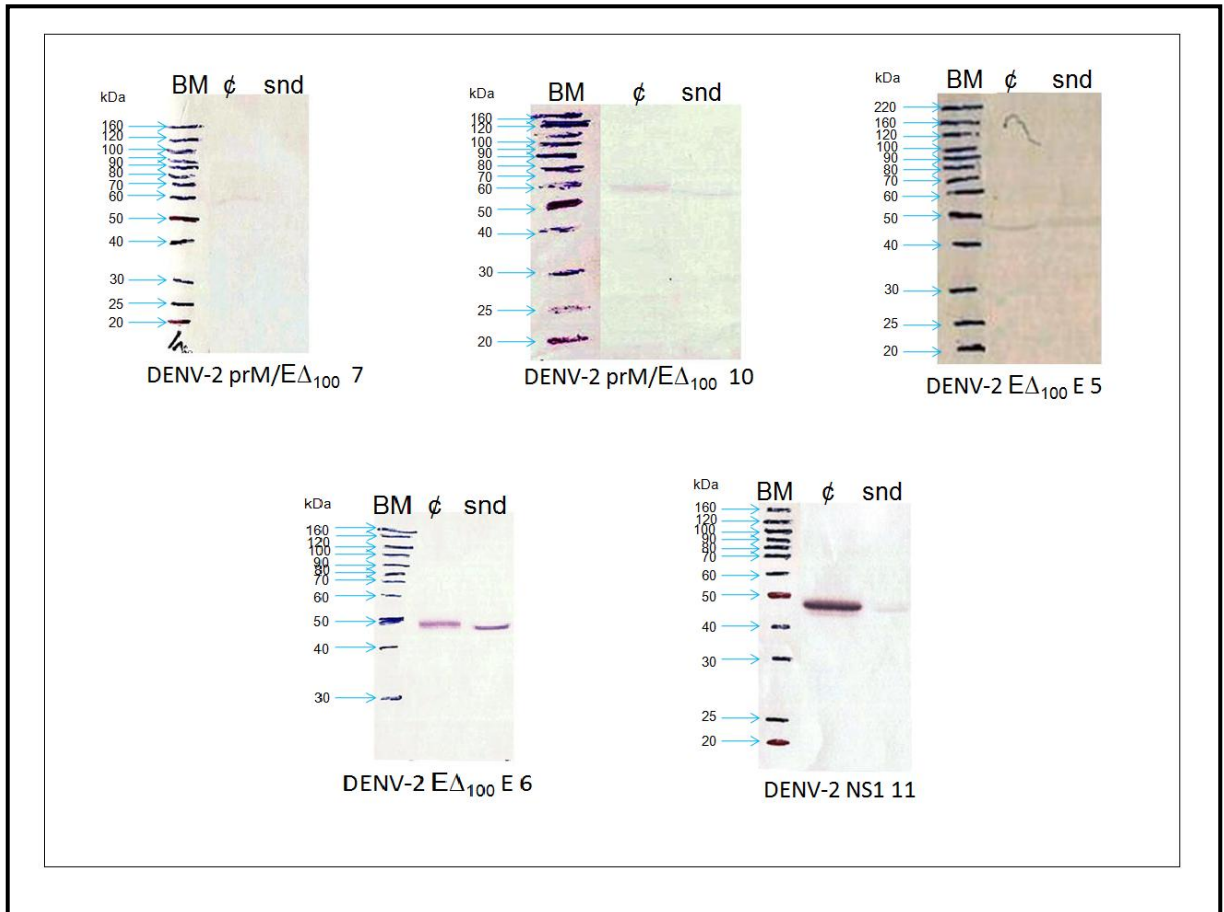


**Figura 7.15.** *Western-Blot* imunomarcado com anticorpo anti-V5 e anticorpo secundário anti-camundongo, conjugado com fosfatase alcalina. Os resultados demonstram a expressão da proteína EΔ<sub>100</sub> de DENV-4, na célula (ϕ) e no meio extracelular (snd) submetidos à cinética de recolhimento. O recolhimento das células foi 48h, 72h, 96h e 120h após a indução. **BM.** *BenchMark protein ladder*, marcador de peso molecular **Mock.** Controle negativo; **GFP.** Controle Positivo.

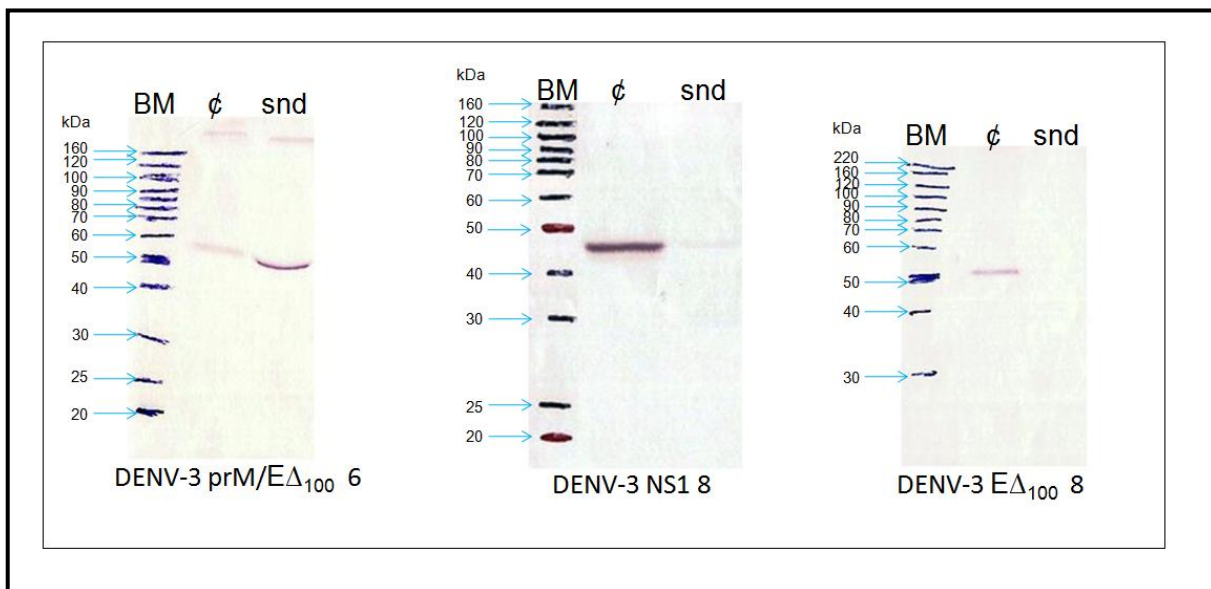
Em seguida, realizamos os ensaios de transfecção dos outros clones para a expressão das proteínas recombinantes. Inicialmente utilizamos como anticorpo para a identificação das proteínas o anticorpo contra o *tag* V5 em ensaios de *western-blot*. Os resultados indicam que houve expressão de proteínas, tanto no sedimento celular como no sobrenadante das culturas de células S2 de *Drosophila* (Figura 7.16 a 7.19). A expressão das proteínas recombinantes prM/E $\Delta_{100}$ , E $\Delta_{100}$  e NS1 de DENV apresentaram tamanho esperado, de aproximadamente 65kDa, 48kDa e 43kDa, respectivamente. As amostras provenientes das outras estratégias para a obtenção de clones referentes às proteínas, ssNS1<sup>c/STOP</sup> e E $\Delta_{100}$ <sup>c/STOP</sup> de DENV-3 (Figura 7.20), não foram testadas com o anticorpo V5, por apresentarem sinal de parada de tradução anterior a sequência codificadora do epítipo V5, contida no plasmídeo. Em suma, ssNS1<sup>c/STOP</sup> não é secretado no sobrenadante das culturas celulares por não conter o peptídeo BIP que promove a translocação e secreção das proteínas recombinantes. O peso molecular de aproximadamente 45 kDa para E $\Delta_{100}$ <sup>c/STOP</sup> e de 42 kDa para ssNS1<sup>c/STOP</sup> foi observado.



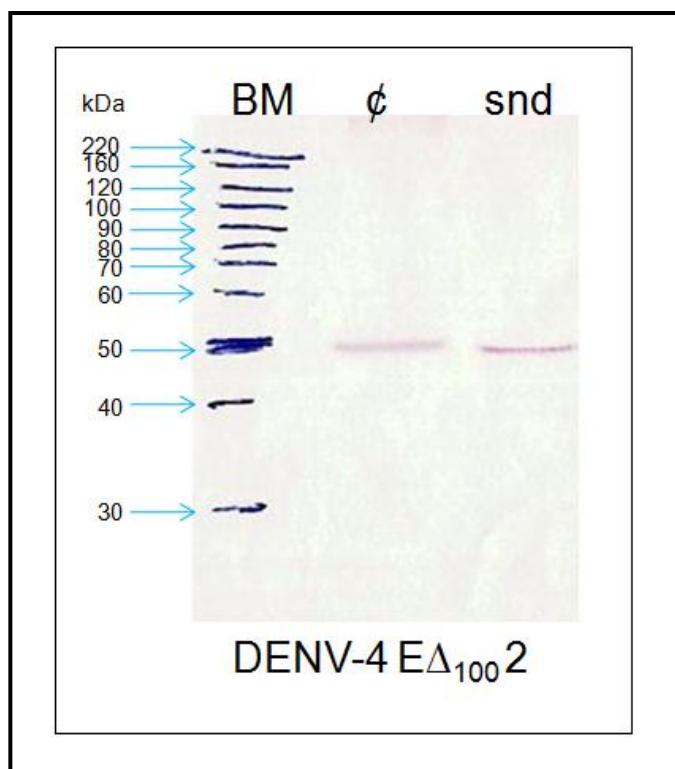
**Figura 7.16.** *Western-Blot* imunomarcado com anticorpo anti-V5 e anticorpo secundário anti-camundongo, conjugado com fosfatase alcalina. Os resultados mostram a expressão das proteínas de DENV-1 na célula (ϕ) e no meio extracelular (snd), geradas a partir dos clones: E $\Delta_{100}$  17 e NS1 11 e 14. **BM.** *BenchMark Protein ladder*, marcador de peso molecular.



**Figura 7.17.** *Western-Blot* imunomarcado com anticorpo anti-V5 e anticorpo secundário anti-camundongo, conjugado com fosfatase alcalina. Os resultados mostram a expressão das proteínas de DENV-2 na célula (φ) e no meio extracelular (snd), geradas a partir dos clones: prM/EΔ<sub>100</sub> 7 e 10, EΔ<sub>100</sub> 5 e 6 e NS1 11. **BM.** *BenchMark Protein ladder*, marcador de peso molecular.

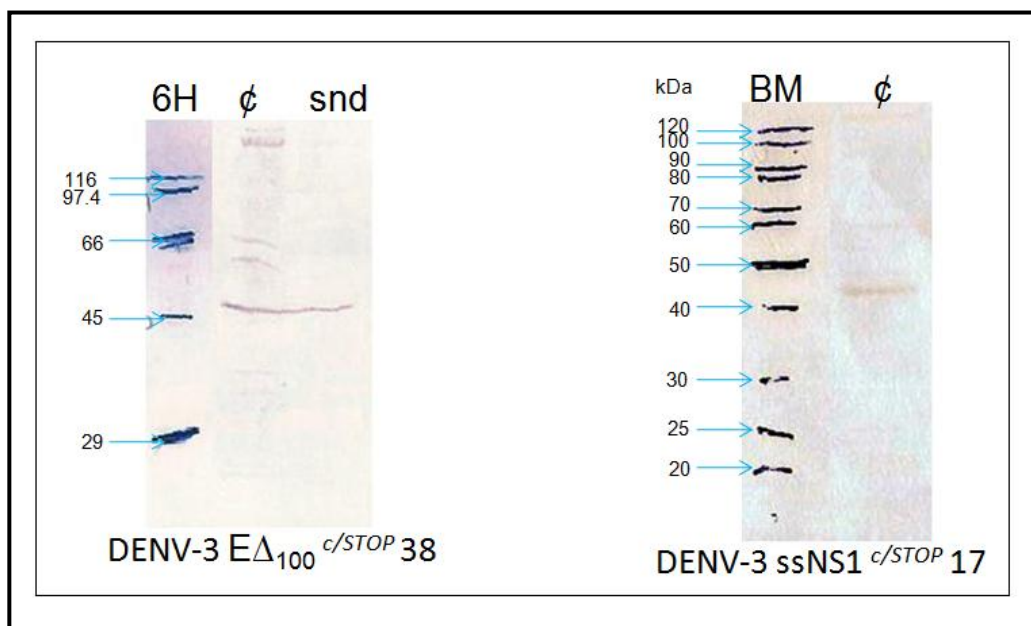


**Figura 7.18.** *Western-Blot* imunomarcado com anticorpo anti-V5 e anticorpo secundário anti-camundongo, conjugado com fosfatase alcalina. Os resultados mostram a expressão das proteínas de DENV-3 na célula ( $\phi$ ) e no meio extracelular (snd), geradas a partir dos clones: prM/E $\Delta_{100}$  6, E $\Delta_{100}$  8 e NS1 8. **BM.** *BenchMark Protein ladder*, marcador de peso molecular.



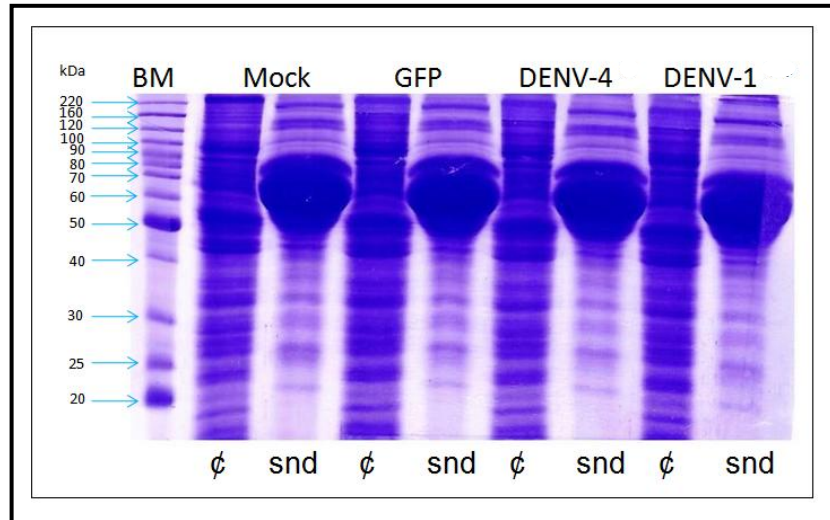
**Figura 7. 19.** *Western-Blot* imunomarcado com anticorpo anti-V5 e anticorpo secundário anti-camundongo, conjugado com fosfatase alcalina. O resultado mostra a expressão da proteína E $\Delta_{100}$  2 de DENV-4 na célula ( $\phi$ ) e no meio extracelular (snd). **BM.** *BenchMark Protein ladder*, marcador de peso molecular .



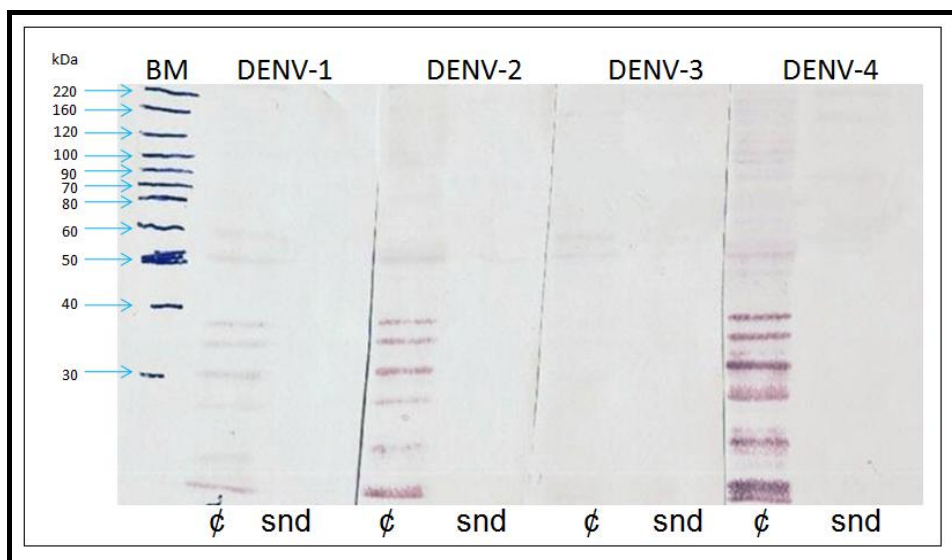


**Figura 7.20.** Western-Blot imunomarcado com anticorpo policlonal anti-DENV3 e anticorpo secundário anti-camundongo, conjugado com fosfatase alcalina. O resultado mostra a expressão das proteínas de DENV-3, geradas a partir de diferentes estratégias abordadas, dos clones  $E\Delta_{100}^{c/STOP}$  38 e ssNS1  $c/STOP$  17.  $\phi$ . Célula; **snd**. Meio extracelular; **6H**. 6H Protein ladder; **BM**. BenchMark Protein ladder, marcador de peso molecular.

Quando os géis SDS-PAGE eram corados diretamente com azul de Comassie ou *GelCode Blue Stain*, não era possível identificar nem as proteínas recombinantes expressas, nem o controle positivo (pMT/BiP/V5-His/GFP) como demonstrado na figura 7.21. As proteínas  $E\Delta_{100}$  dos DENV-1, -2, -3 e -4, foram testadas com anticorpos policlonais específicos contra DENV-1, -2, -3 ou -4 (Figura 7.22, e ao contrário do resultado verificado com o anticorpo V5, a expressão da proteína  $E\Delta_{100}$  dos quatro sorotipos de DENV, não é clara, sendo visualizadas somente bandas espúrias.



**Figura 7.21.** Perfil eletroforético de gel SDS-PAGE corado com Azul de Comassie. **BM.** *Benchmark Protein ladder*, marcador de peso molecular; **Mock.** Controle negativo; **GFP.** Controle Positivo; **DENV-4.** Proteína recombinante E $\Delta_{100}$  2 de DENV-4; **DENV-1.** Proteína recombinante NS1 11 de DENV-1.



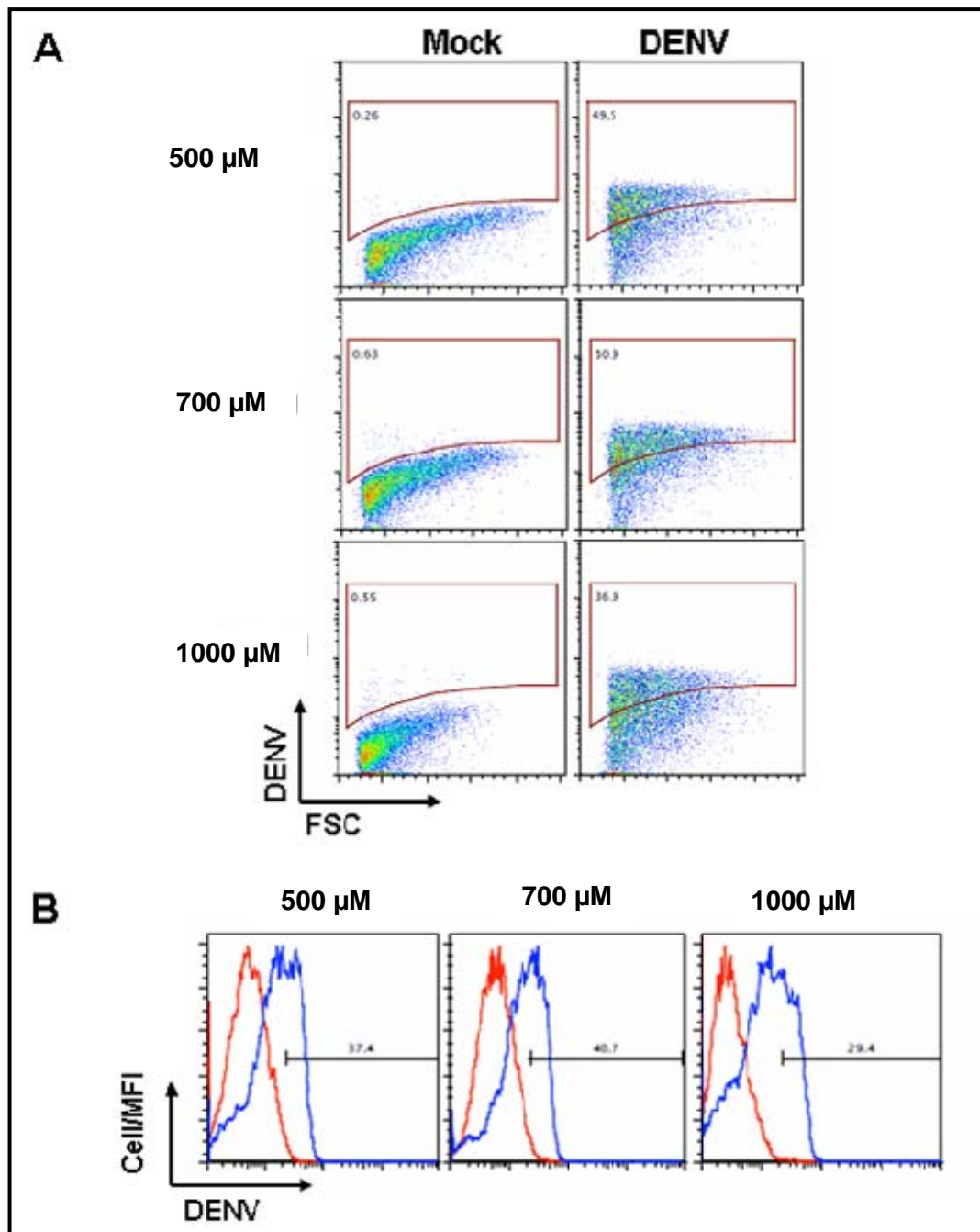
**Figura 7.22.** *Western-blot* das proteínas recombinantes DENV-1 E $\Delta_{100}$  17, DENV-2 E $\Delta_{100}$  6, DENV-3 E $\Delta_{100}$  8 e DENV-4 E $\Delta_{100}$  2. As amostras foram imunomarcadas com anticorpos policlonais contra os DENV-1, -2, -3 e -4, respectivamente, e contra-marcadas com anticorpo anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina. **BM.** *Benchmark Protein ladder*, marcador de peso molecular;  $\phi$ . Célula; **snd.** Meio extracelular.



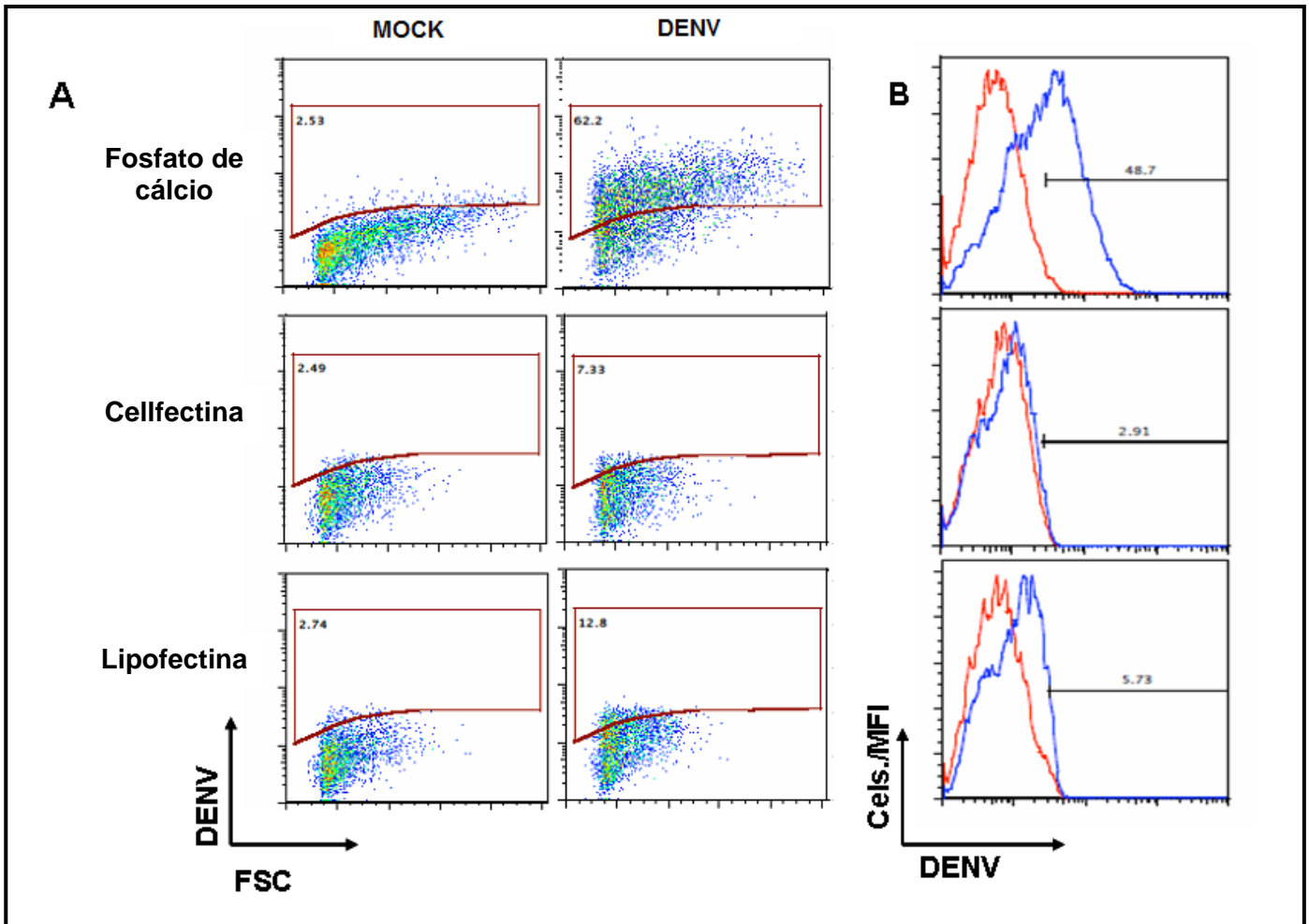
### 7.3 Padronização da quantidade de CuSO<sub>4</sub> e metodologias de transfecção através da análise em citometria de fluxo

Visando ainda melhorar o rendimento da expressão de proteínas recombinantes, foram testadas outras metodologias, como a concentração de sulfato de cobre para a expressão mais significativa de proteínas, na qual o clone recombinante prM/EΔ<sub>100</sub> 6 de DENV-3 e o controle negativo (plasmídeo sem inserto pMT/BiP/V5-His) foram transfectados em células S2, como descrito no tópico 6.2.8. Após a lavagem das células, foram adicionados 500, 700 e 1000 µM de CuSO<sub>4</sub> e posteriormente as células foram recolhidas da placa e o sedimento estocado para ensaios em citômetro de fluxo. Paralelamente, estes mesmos clones foram transfectados para se testar a metodologia de transfecção que produzisse a expressão máxima de proteínas recombinantes em células de *Drosophila*, como a metodologia de fosfato de cálcio, com reagente *Cellfectina* ou *Lipofectina*. O sedimento também foi estocado para ensaio por citometria de fluxo.

Para os ensaios de citometria de fluxo, as amostras foram lidas através do equipamento BD FACSCalibur e o número total de eventos analisados foi de 20.000. A análise do número de células expressando a proteína recombinante, bem como, a intensidade da expressão está demonstrada nas figuras 7.23 e 7.24, no qual foi utilizado o software de análise FlowJo.



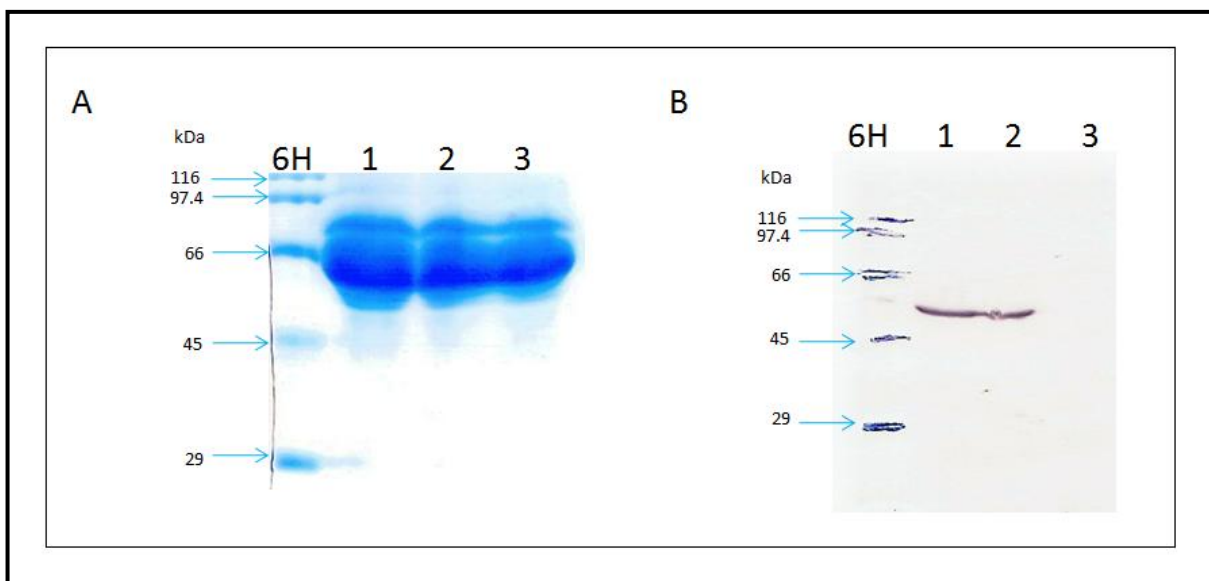
**Figura 7.23.** Análise da porcentagem de células expressando a proteína recombinante prM/E $\Delta_{100}$  6 de DENV-3 (A) e quantificação da expressão da proteína quando comparada com o mock (B), após indução com 500, 700 e 1000 $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ . As células foram imunomarcadas com anticorpo policlonal anti-DENV3 e contra-marcadas com anticorpo anti-camundongo conjugado com ficoeritrina. **Mock.** Controle Negativo; **DENV.** prM/E $\Delta_{100}$  6 de DENV-3.



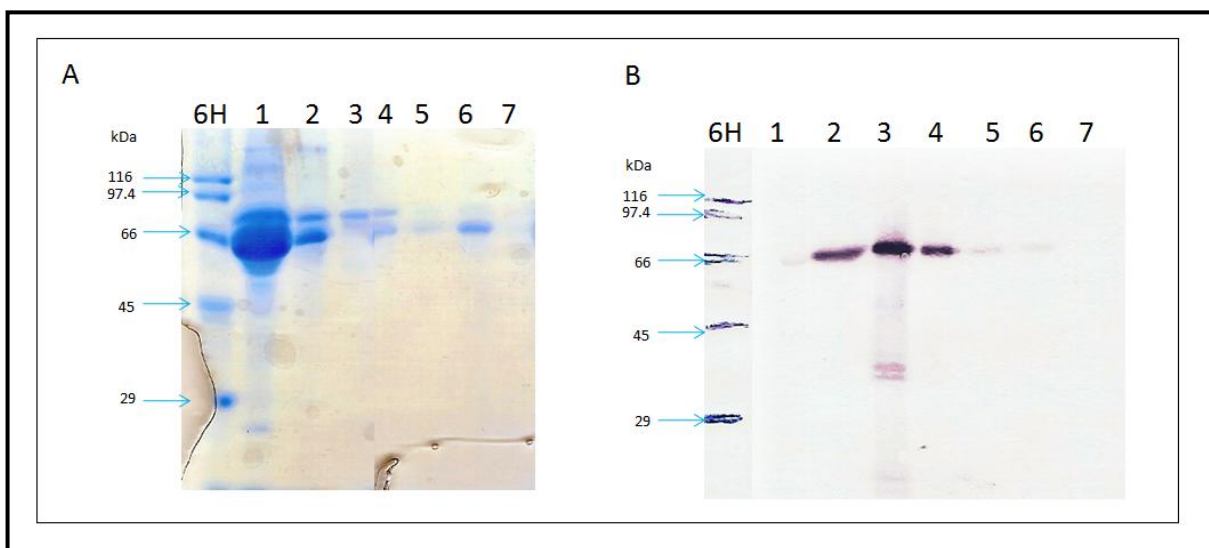
**Figura 7.24.** Análise da porcentagem de células expressando a proteína recombinante prM/EΔ<sub>100</sub> 6 de DENV-3 (A) e quantificação da expressão da proteína, quando comparada ao mock (B), após transfecção através de métodos como fosfato de cálcio (representado pelo reagente principal, cloreto de cálcio, CaCl<sub>2</sub>) ou com reagentes como *Cellfectina* e *Lipofectina*. As células foram e imunomarcadas com anticorpo policlonal anti-DENV3 e contra-marcadas com anticorpo anti-camundongo conjugado com phicoeritrina. **Mock.** Controle Negativo; **DENV.** prM/EΔ<sub>100</sub> 6 de DENV-3.

## 7.4 Purificação de proteínas recombinantes

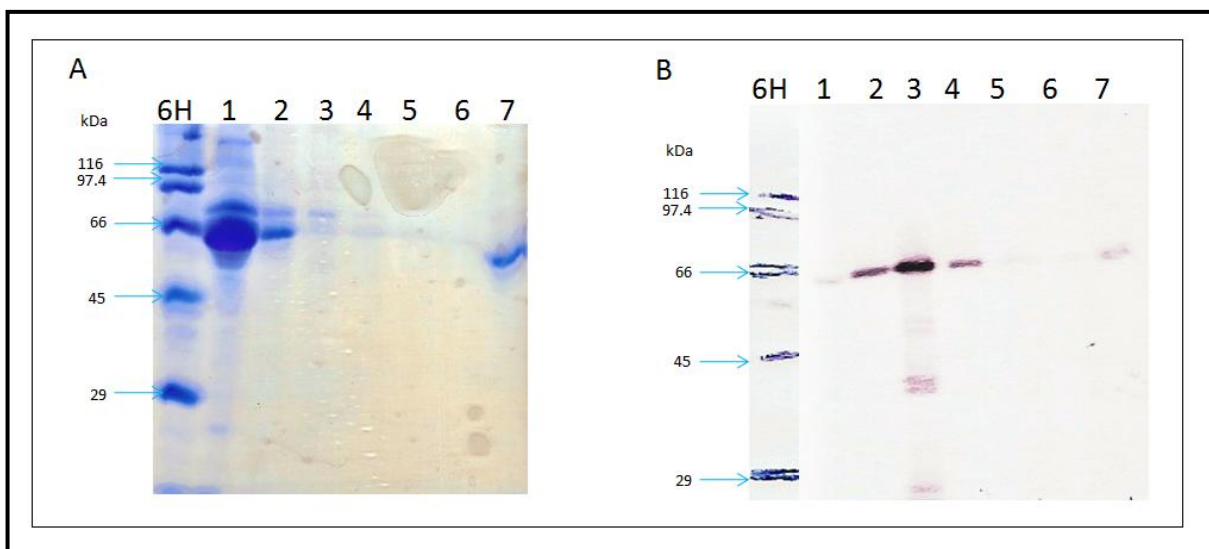
Para testar metodologias de purificação, foi escolhido o clone de DENV-3 prM/E $\Delta_{100}$  6, com o qual foi feita uma transfecção em triplicata em garrafas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, obtendo-se o volume final de 15 mL de sobrenadante contendo a proteína expressa no meio extracelular. Também foi feita uma transfecção em uma garrafa do controle negativo, o vetor pMT/BiP/V5-His sem o inserto, obtendo-se o volume final de 5 mL. Um total de 10 mL do meio extracelular da transfecção de prM/E $\Delta_{100}$  foram dialisados, enquanto os 5mL restantes foram purificados pela coluna de dessalinização PD-10, assim como todo o volume do controle negativo. Após esta primeira etapa de purificação, foi usada a técnica de *Western-Blot* para se verificar a eficiência do processo, utilizando o anticorpo contra a proteína de etiqueta V5 (Figura 7.25B). Na figura 7.25A pode-se observar o gel corado com *GelCode Blue Stain*. Como esperado, somente o controle negativo não reagiu, indicando assim que as metodologias aplicadas nesta primeira etapa permitiram obter a proteína purificada. Em seguida, tanto a proteína dialisada, que passou pela coluna PD-10, como o controle negativo foram submetidos à purificação por coluna de afinidade. Alíquotas da porção que não se ligou à resina, do lavado, das eluições (1 a 4) e a do que permaneceu aderido à resina, foram submetidas à eletroforese e posteriormente o gel foi corado com *GelCode Blue Stain* (7.26 e 7.27 A) e feito o *Western-Blot*, utilizando o anticorpo contra a proteína de etiqueta V5 (Figuras 7.26 e 7.27 B).



**Figura 7.25.** Expressão da proteína prM/E $\Delta_{100}$  6 de DENV-3 após a primeira etapa de purificação, diálise (1) ou dessalinização pela coluna PD-10 (2). O controle negativo está identificado na coluna 3. **6H.** 6H Protein ladder; **A.** Gel SDS-PAGE corado com *GelCode Blue Stain*; **B.** *Western-Blot* imunomarcado com anticorpo anti-V5 e contramarcado anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina.

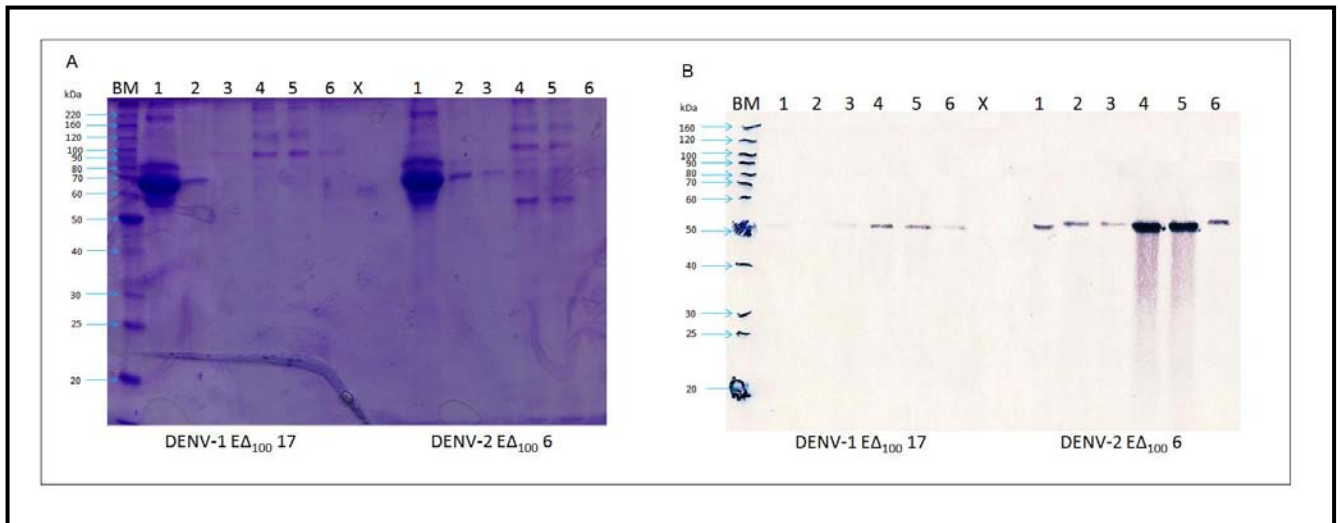


**Figura 7.26.** Proteína prM/E $\Delta_{100}$  6 de DENV-3 submetida à segunda etapa de purificação (coluna de afinidade), após diálise. **A.** Gel SDS-PAGE corado com *GelCode Blue Stain*; **B.** *Western-Blot* imunomarcado com anticorpo anti-V5 e contramarcado anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina. **6H.** 6H Protein ladder; **1.** Fração não ligada à resina; **2.** Fração após lavagem da resina; **3.** Eluído 1; **4.** Eluído 2; **5.** Eluído 3; **6.** Eluído 4; **7.** Resina.

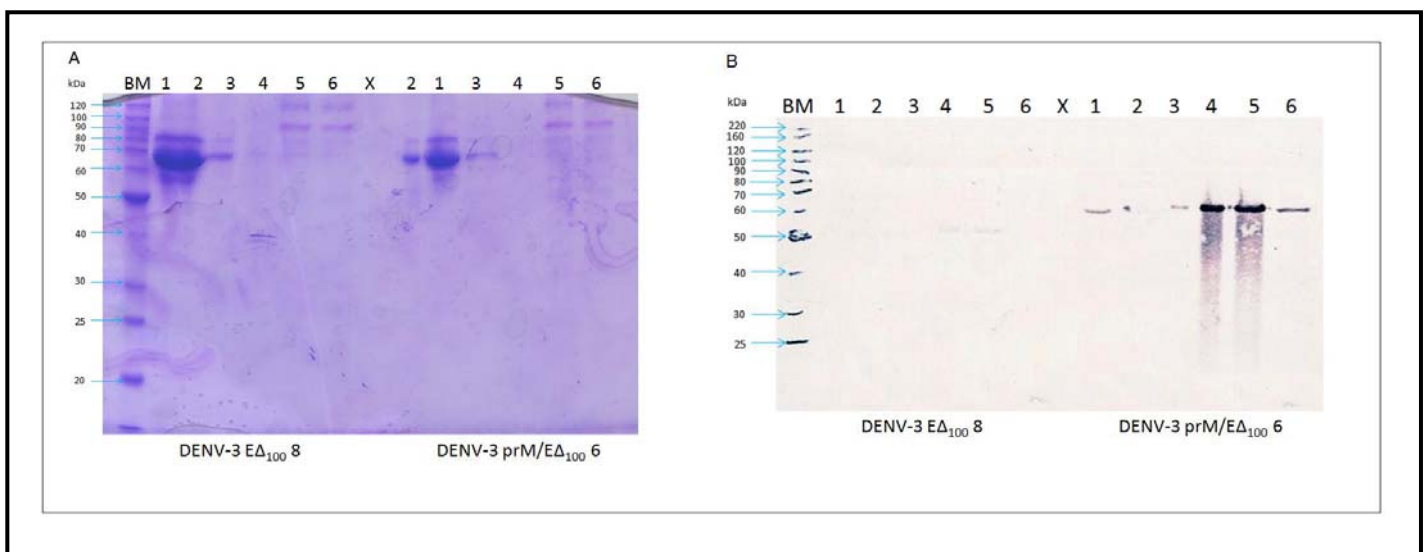


**Figura 7.27.** Proteína prM/E $\Delta_{100}$  6 de DENV-3 submetida à segunda etapa de purificação (coluna de afinidade), após dessalinização. **A.** Gel SDS-PAGE corado com *GelCode Blue Stain*; **B.** *Western-Blot* imunomarcado com anticorpo anti-V5 e contramarcado anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina. **6H.** 6H *Protein ladder*; **1.** Fração não ligada à resina; **2.** Fração após lavagem da resina; **3.** Eluído 1; **4.** Eluído 2; **5.** Eluído 3; **6.** Eluído 4; **7.** Resina.

Em seguida, foram purificadas as proteínas de E $\Delta_{100}$  17 de DENV-1, E $\Delta_{100}$  6 de DENV-2, E $\Delta_{100}$  8 e E $\Delta_{100}^{c/STOP}$  38 de DENV-3, E $\Delta_{100}$  2 de DENV-4 e novamente prM/E $\Delta_{100}$  6 de DENV-3. Colunas de dessalinização (*PD-10*) foram utilizadas para remover o CuSO<sub>4</sub> presente no meio, utilizado para a indução da expressão das proteínas. Estas colunas foram previamente equilibradas com 20 mL de 50mM Tris-HCl pH 7.5, em seguida, os sobrenadantes das culturas adicionados e as frações eluídas das colunas, estocadas. Após esta primeira etapa de purificação, 500  $\mu$ L da resina *Talon Metal Affinity resin* (BD-Biosciences) previamente equilibrada em tampão com pH neutro foram adicionados a cada um dos eluídos, e incubados a 4°C, sob agitação constante, por 4 horas. Para purificação, a resina foi aplicada nas colunas descartáveis, e fração que não se ligou à resina foi obtida pós decantação e estocada. Em seguida a resina foi lavada duas vezes com 5 mL de tampão de lavagem (50mM Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl e 10mM Imidazol) para eliminar interações não específicas. A eluição das proteínas foi realizada em três etapas com 250  $\mu$ L de 50mM Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl e 500mM Imidazol. Alíquotas de todas as etapas eram visualizadas por coloração em gel SDS-PAGE 13% e o ensaio da expressão das proteínas foi através da técnica de *Western-blot*, demonstradas pelas figuras 7.28 a 7.31.

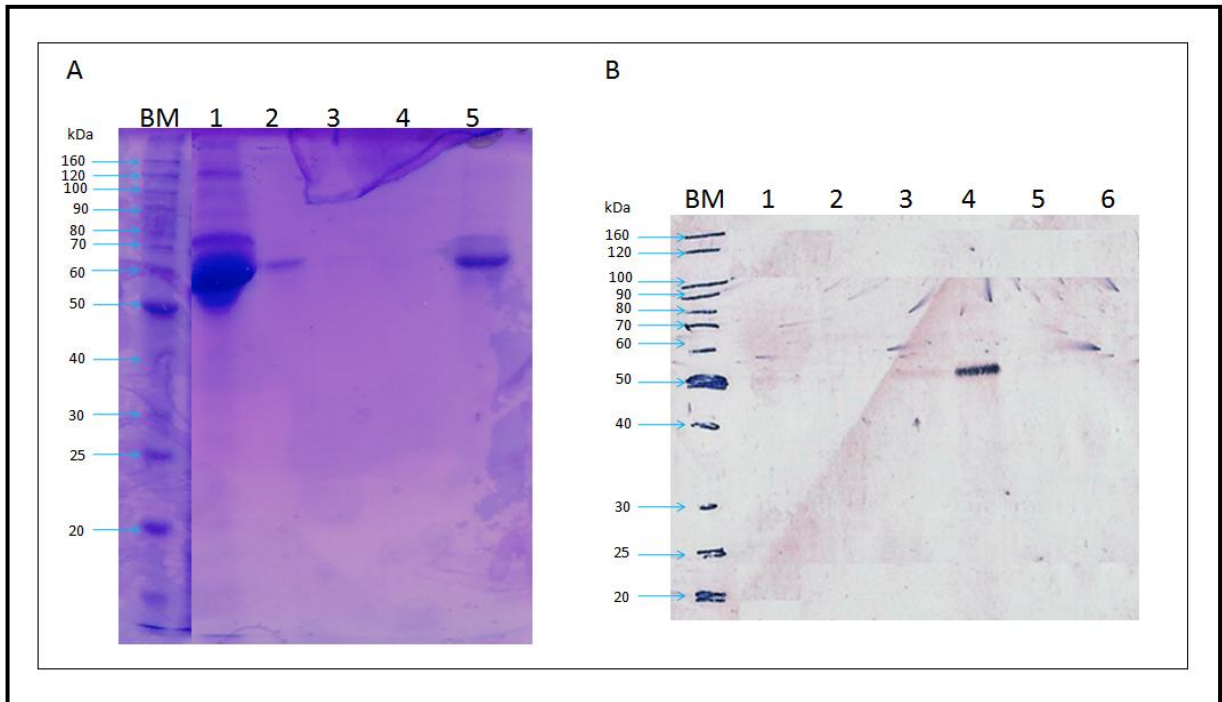


**Figura 7.28.** Proteínas  $E\Delta_{100}$  17 de DENV-1 e  $E\Delta_{100}$  6 de DENV-2 submetidas à purificação, após dessalinização. **A.** Gel SDS-PAGE corado com Azul de Comassie; **B.** *Western-Blot* imunomarcado com anticorpo anti-V5 e contramarcado anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina. **BM.** *Benchmark Protein ladder*; **1.** Fração não ligada à resina; **2.** Fração após lavagem da resina; **3.** Eluído 1; **4.** Eluído 2; **5.** Eluído 3; **6.** Resina.

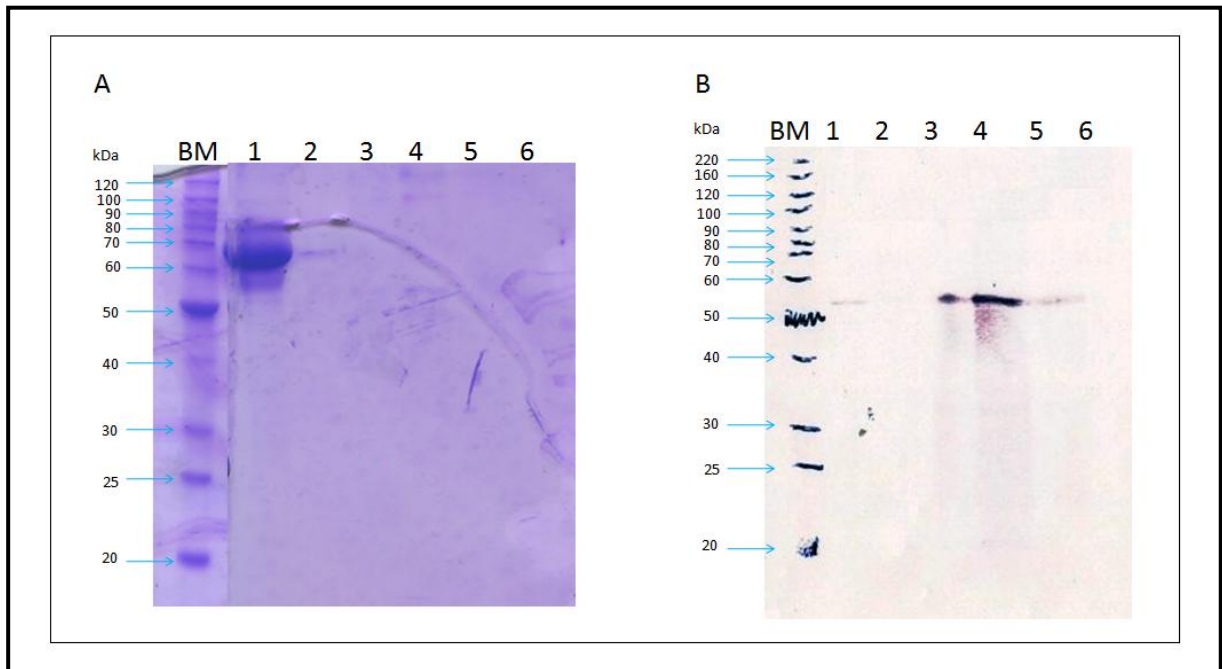


**Figura 7.29.** Proteínas  $E\Delta_{100}$  8 e prM/  $E\Delta_{100}$  6 de DENV-3 submetidas à purificação, após dessalinização. **A.** Gel SDS-PAGE corado com Azul de Comassie; **B.** *Western-Blot* imunomarcado com anticorpo anti-V5 e contramarcado anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina. **BM.** *Benchmark Protein ladder*; **1.** Fração não ligada à resina; **2.** Fração após lavagem da resina; **3.** Eluído 1; **4.** Eluído 2; **5.** Eluído 3; **6.** Resina.





**Figura 7.30.** Proteína  $E\Delta_{100}^{c/STOP}$  38 de DENV-3 submetida à purificação, após dessalinização. **A.** Gel SDS-PAGE corado com Azul de Comassie; **B.** *Western-Blot* imunomarcado com anticorpo anti-V5 e contramarcado anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina. **BM.** Benchmark *Protein ladder*; **1.** Fração não ligada à resina; **2.** Fração após lavagem da resina; **3.** Eluído 1; **4.** Eluído 2; **5.** Eluído 3; **6.** Resina.

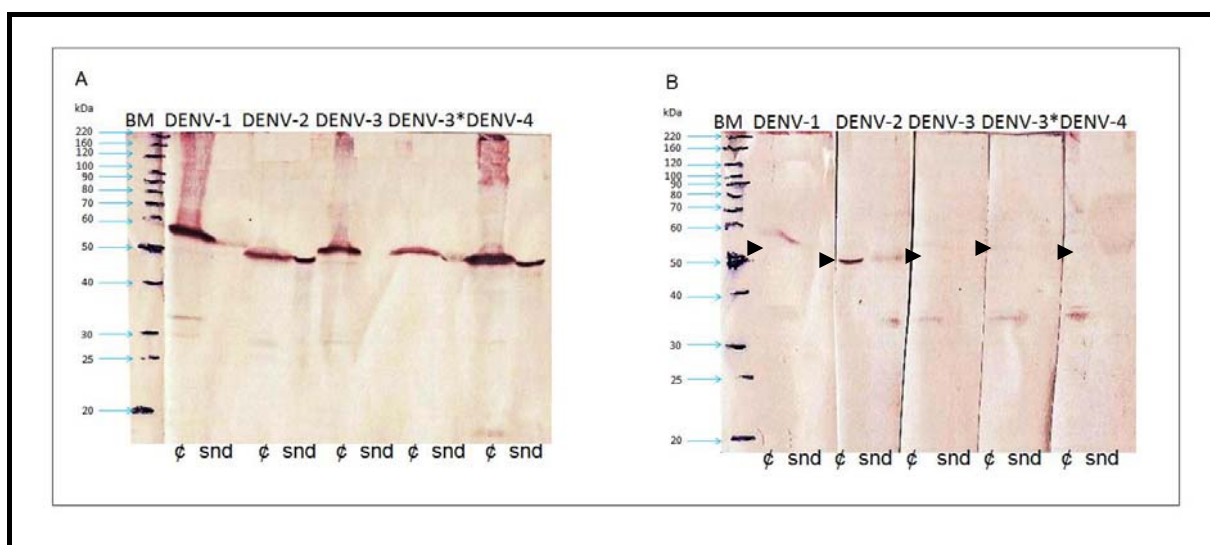


**Figura 7.31.** Proteína  $E\Delta_{100}$  2 de DENV-4 submetida à purificação, após dessalinização. **A.** Gel SDS-PAGE corado com Azul de Comassie; **B.** *Western-Blot* imunomarcado com anticorpo anti-V5 e contramarcado anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina. **BM.** BenchMark *Protein ladder*; **1.** Fração não ligada à resina; **2.** Fração após lavagem da resina; **3.** Eluído 1; **4.** Eluído 2; **5.** Eluído 3; **6.** Resina.



## 7.5 Expressão de proteínas de Envelope após a seleção de linhagens estáveis de células S2

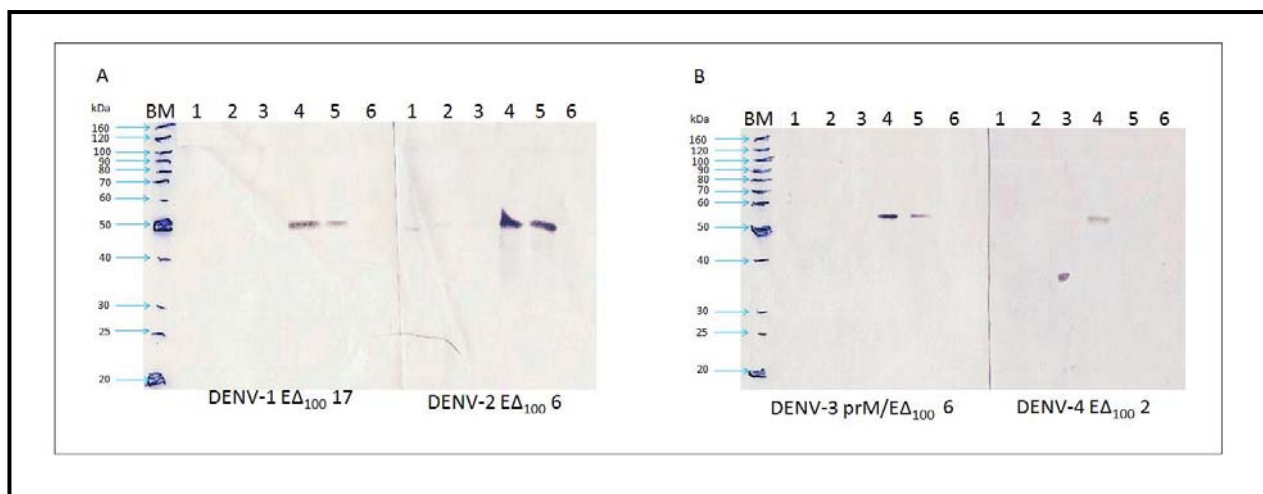
Após a etapa de caracterização das proteínas recombinantes, iniciou-se o processo para gerar linhagens de células S2 expressando de forma estável as proteínas recombinantes. Foram utilizados neste processo os clones do gene  $E\Delta_{100}$  de DENV-1, -2, -3 e -4, juntamente com  $prM/E\Delta_{100}$  de DENV-3. Para tal, foram realizados ensaios de co-transfecção do plasmídeo recombinante e o plasmídeo denominado pCoBlast (Invitrogen). Posteriormente à seleção, as células resistentes ao antibiótico blasticidina eram recuperadas para ensaios da expressão de proteínas por *Western-blot*, utilizando o anticorpo contra a proteína de etiqueta V5 (Figura 7.32 A) ou anticorpo policlonal específico (Figura 7.32 B).



**Figura 7.32.** Expressão de proteínas recombinantes  $E\Delta_{100}$  de DENV-1, -2, -3 e -4 e  $prM/E\Delta_{100}$  de DENV-3\* após seleção de linhagens estáveis de células S2. **A.** *Western-Blot* imunomarcado com anticorpo anti-V5 e contramarcado anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina; **B.** *Western-Blot* imunomarcado com anticorpo policlonal anti-DENV1, anti-DENV2, anti-DENV3, anti-DENV-4 respectivamente, contramarcado anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina. **BM.** Benchmark *Protein ladder*; **ç.** Célula; **snd.** Meio extracelular.

## 7.6 Purificação de proteínas recombinantes após processo de congelamento/descongelamento das linhagens estáveis de células

O congelamento das linhagens expressando de forma estável as proteínas recombinantes foi realizado como descrito no tópico 6.2.11. Cada criotubo com as células era descongelado iniciando as subculturas. Nesta etapa,  $3 \times 10^7$  células/ mL eram semeadas em garrafas de 150 cm<sup>2</sup> com 30 mL de meio Schneider completo com 25 µg/µL de blasticidina, induzidas como descrito anteriormente e posteriormente recuperadas para purificação, conforme descrito no tópico 6.2.13. A figura 7.33 demonstra a purificação das proteínas E $\Delta_{100}$  de DENV-1, -2 e -4 e prM/E $\Delta_{100}$  de DENV-3, após a etapa de purificação.

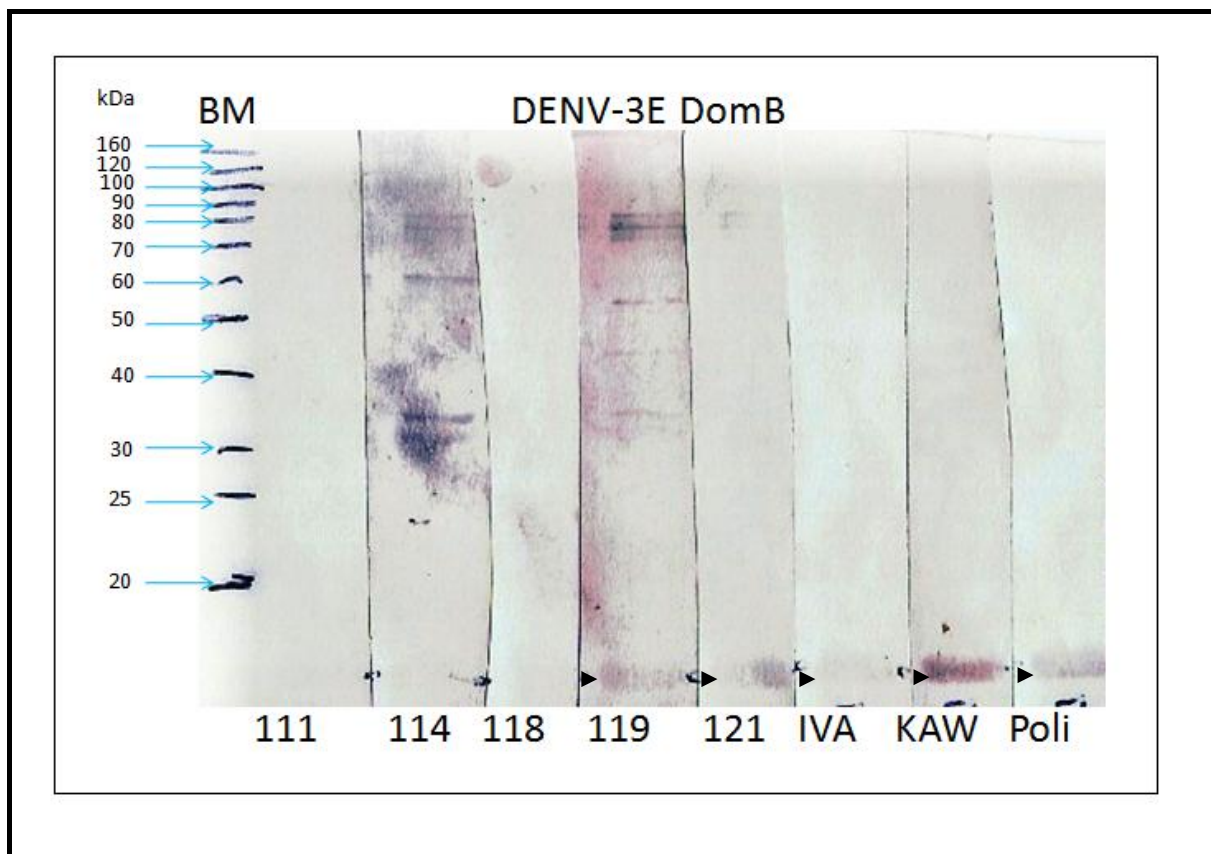


**Figura 7.33.** Proteína E $\Delta_{100}$  de DENV-1 e -2, prM/E $\Delta_{100}$  de DENV-3 e E $\Delta_{100}$  de DENV-4 submetidas à purificação, após congelamento/descongelamento de células recombinantes estáveis. **A.** *Western-Blot* imunomarcado com anticorpo policlonal anti-DENV1 e anti-DENV2, respectivamente, contramarcados com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina; **B.** *Western-Blot* imunomarcado com anticorpo anti-DENV3 e anti-DENV4, respectivamente, contramarcados com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina. **BM.** *BenchMark Protein ladder*; **1.** Fração não ligada à resina; **2.** Fração após lavagem da resina; **3.** Eluído 1; **4.** Eluído 2; **5.** Eluído 3; **6.** Resina.

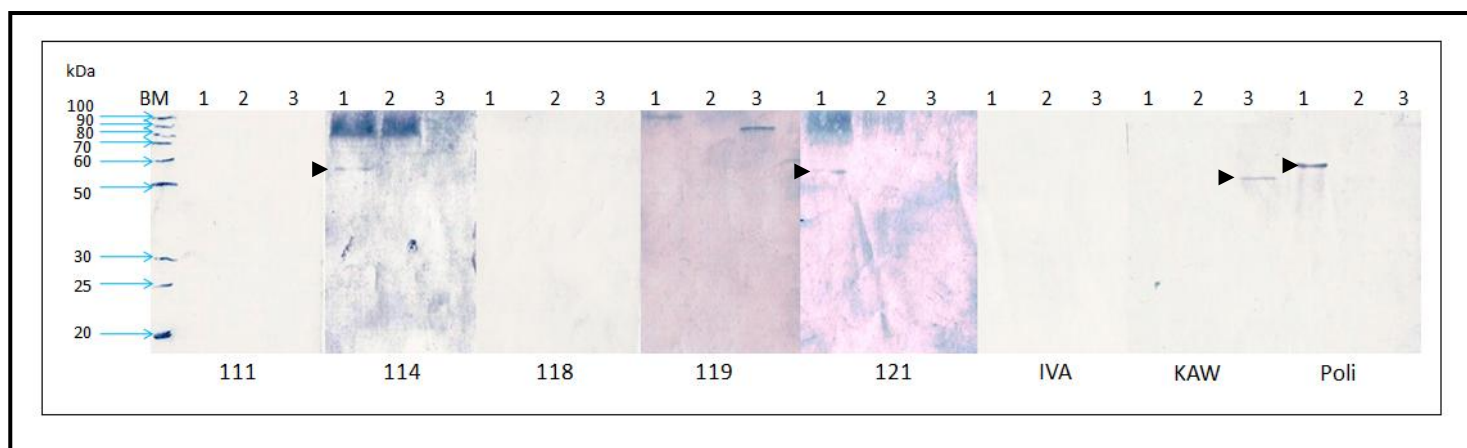
### **7.7 Análise da imunogenicidade das proteínas recombinantes com soros humanos de pacientes**

Alíquotas das proteínas recombinantes E $\Delta_{100}$  e prM/E $\Delta_{100}$  de DENV-3, clonadas em pMT/BiP/V5-His, expressas e purificadas (tópico 3.2.12), juntamente com uma alíquota do sedimento de célula que expressou a proteína recombinante NS1, também de DENV-3, foram aplicadas em géis SDS-PAGE 13 %. Como controle positivo, foi utilizada a proteína recombinante DomB expressa em sistema procariótico, purificada e aplicada em gel SDS-PAGE 15%. Foram utilizados soros humanos positivos para IgG anti-dengue ou IgM anti-dengue, provenientes do LACEN (Laboratório Central Curitiba). Como controle positivo, foi usado soro policlonal anti-DENV3.

Os soros identificados como 111, 118, IVA e KAW são positivos para imunoglobulina IgM, enquanto os soros 114, 119 e 121 são positivos para imunoglobulina IgG. A figura 7.34 demonstra o perfil eletroforético do controle positivo DomB, após reação com os soros humanos. Foram observadas reações positivas nas tiras reagidas com o soro policlonal (controle), 119 e 121 (imunoglobulina IgG positivos) e IVA e KAW (imunoglobulina IgM positivos). A figura 7.35 demonstra o perfil eletroforético das proteínas recombinantes purificadas E $\Delta_{100}$  e prM/E $\Delta_{100}$  e a proteína recombinante NS1 de DENV-3, após reação com os soros humanos. Foram observadas reações positivas com o anticorpo policlonal (apesar de somente prM/E $\Delta_{100}$  ser mais evidente). A prM/E $\Delta_{100}$  foi reativa com os soros IgG positivos 114 e 121, enquanto a NS1 foi reativa com a amostra IgM positiva KAW



**Figura 7.34.** Western-Blot da Proteína DomB de DENV-3 submetida à imunomarcagem com soros humanos IgG positivos 114, 119, 121, contramarcados com anticorpo secundário anti-humano IgG conjugado com fosfatase alcalina; com soros humanos IgM positivos 111, 118, IVA e KAW, contramarcados com anticorpo secundário anti-humano IgM conjugado com fosfatase alcalina; e com o controle positivo, o anticorpo policlonal anti-DENV3 contramarcado com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina. **BM.** BenchMark Protein ladder.

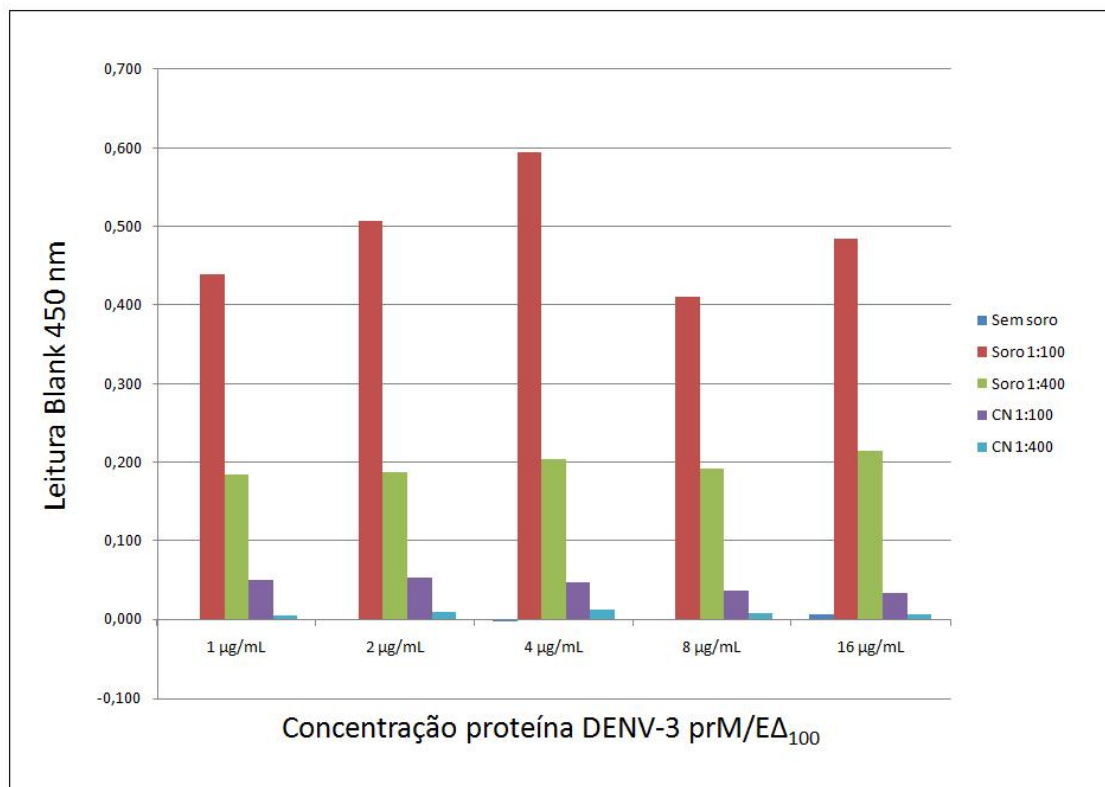


**Figura 7.35.** Western-Blot das Proteínas prM/E $\Delta_{100}$  (1), E $\Delta_{100}$  (2) e NS1 (3) de DENV-3 submetidas à imunomarcagem com soros humanos IgG positivos 114, 119, 121, contramarcados com anticorpo secundário anti-humano IgG conjugado com fosfatase alcalina; com soros humanos IgM positivos 111, 118, IVA e KAW, contramarcados com anticorpo secundário anti-humano IgM conjugado com fosfatase alcalina; e com o controle positivo, o anticorpo policlonal anti-DENV3 contramarcado com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina. **BM.** BenchMark Protein ladder.

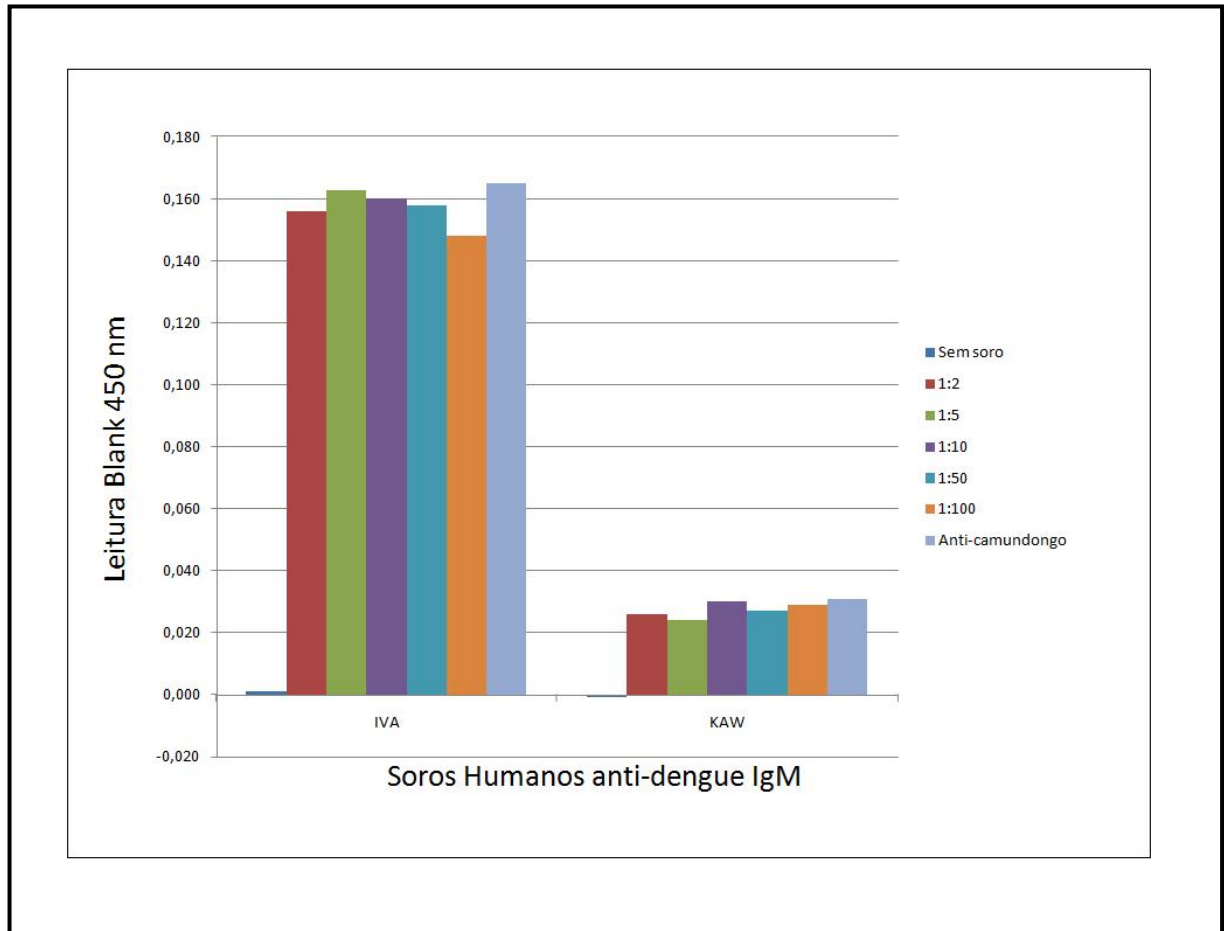
### **7.8 Teste sorológico formato ELISA com o antígeno recombinante prM/E $\Delta$ <sub>100</sub> de DENV-3**

Alguns ensaios imunoenzimáticos preliminares foram realizados com a proteína purificada prM/E $\Delta$ <sub>100</sub> de DENV-3, como descrito no tópico 6.2.15. Inicialmente foi realizado um ELISA indireto, no qual uma placa foi sensibilizada com antígeno recombinante purificado, diluído para concentrações de 1, 2, 4, 8 e 16  $\mu$ g/mL. Posteriormente, era acrescentado uma amostra de soro humano identificado como 114, positivo para IgG anti-DENV. O soro foi diluído para concentrações finais de 1:100 e 1:400. Como controle negativo foi utilizado um soro negativo para DENV, também diluído 1:100 e 1:400. Após incubação e lavagem, o segundo anticorpo anti-IgG humano diluído 1:500 era adicionado. Após adição do cromógeno, a densidade óptica (DO) de cada poço era lida a 450nm. Descontando-se o valor obtido da leitura do controle, que consistia somente no tampão 1X PBS/ 0.01% (sem soro), preconizou-se o valor real da leitura e a figura 7.36 demonstra que a especificidade do anticorpo IgG é mais evidente quando a proteína está diluída na concentração de 4  $\mu$ g/mL.

Em outro ELISA, do tipo sanduíche, dois soros positivos para IgM anti-dengue, identificados como IVA e KAW, foram diluídos para uma concentração final de 1:100 e colocados na placa. Posteriormente, era acrescentado o antígeno, a proteína recombinante prM/E $\Delta$ <sub>100</sub> de DENV-3 nas diluições 1:2, 1:5, 1:10, 1:50 e 1:100. Após incubação e lavagem, os poços eram incubados com o anticorpo policlonal anti-DENV3, na diluição 1:500. Uma nova lavagem era realizada e em seguida o último anticorpo, anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, diluído 1:1200. Após nova incubação e lavagem, foi adicionado cromógeno e leitura da densidade óptica (DO) a 450nm. Descontando-se o valor obtido da leitura do controle, em que somente o tampão 1X PBS/ 0.01% (sem soro) era aplicado no poço, foi calculado o valor real da leitura e a figura 7.37 demonstra que não houve especificidade do antígeno contra os soros humanos IgM positivos.



**Figura 7.36.** Leitura da densidade óptica a 450nm da especificidade do anticorpo anti- humano IgG contra diferentes concentrações (1, 2, 4, 8 e 16 µg/mL) do antígeno, a proteína recombinante prM/EΔ<sub>100</sub>. **Sem Soro.** Somente o tampão 1X PBS/ 0.01% adicionado; **Soro 1:100.** Soro anti-humano IgG 114 diluído 1:100; **Soro 1:400.** Soro anti-humano IgG 114 diluído 1:400; **CN 1:100.** Controle negativo diluído 1:100, **CN 1:400.** Controle negativo diluído 1:400.



**Figura 7.37.** Leitura da densidade óptica a 450nm da especificidade do antígeno, a proteína recombinante prM/E $\Delta_{100}$ , diluída 1:2, 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, contra anticorpos anti-humano IgM IVA e KAW. **Sem Soro.** Somente o tampão 1X PBS/ 0.01% adicionado; **Anti-camundongo.** Somente adicionado o anticorpo IgG anti-camundongo conjugado com peroxidase

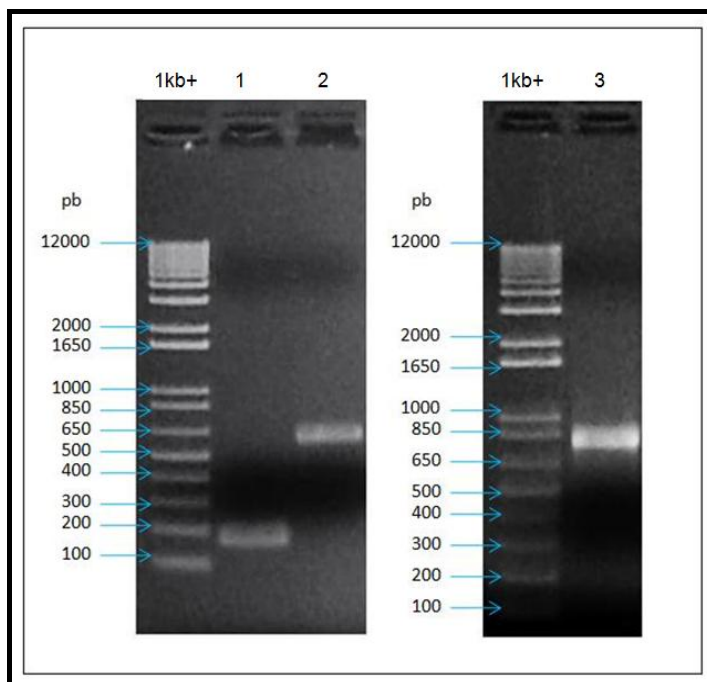
## 8. RESULTADOS DA EXPRESSÃO FUNCIONAL DA PROTEASE RECOMBINANTE DE VFA

### 8.1 Clonagem da protease quimérica (NS2B/NS3<sub>pro</sub>) em *E.coli*

Para a expressão funcional da serina protease do VFA utilizamos a estratégia descrita por LEUNG *et al.* (2001), na qual o co-fator, formado por aproximadamente 40 aminoácidos do domínio hidrofóbico central da proteína NS2B, é ligado ao domínio protease, de aproximadamente 190 aminoácidos, via um “*linker*” constituído de quatro glicinas, uma serina e outras quatro glicinas.

A cepa vacinal 17DD do vírus de febre amarela foi utilizada para expressão da proteína recombinante. A figura 8.1 representa o perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos de DNA obtidos nas reações de PCR, correspondentes ao domínio do co-fator (NS2B) e da serina protease (NS3<sub>pro</sub>) apresentando a massa molecular esperada, de aproximadamente 160 e 600 pares de bases, respectivamente. Após a purificação das amostras, foi gerado o segmento de DNA correspondente a proteína quimérica NS2B/NS3<sub>pro</sub> através de reação de PCR (tópico 6.3.1). A figura 8.1 representa o perfil eletroforético do produto obtido com a massa molecular esperada, de aproximadamente 740 pares de bases.

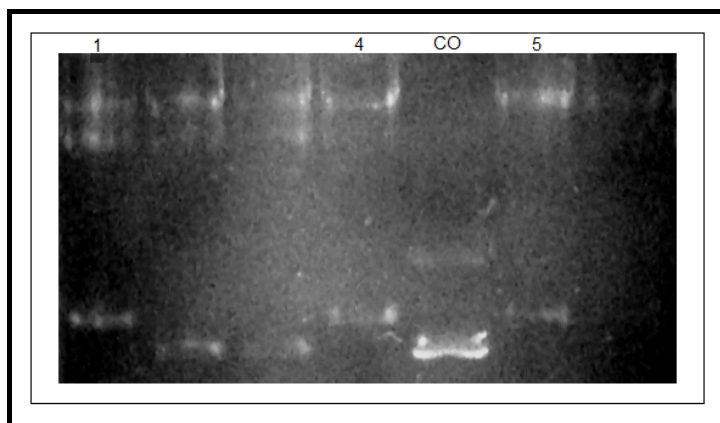




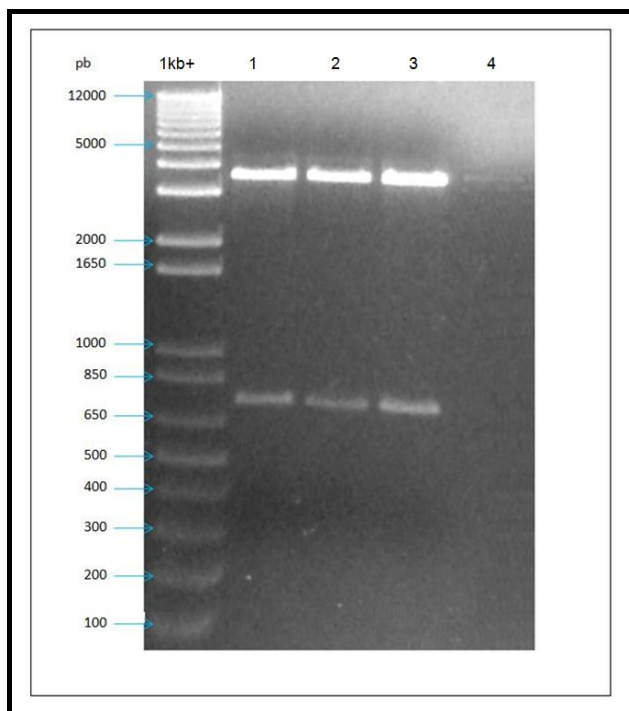
**Figura 8.1.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da amplificação por PCR dos genes correspondentes aos domínios do co-fator (NS2B), da protease (NS3<sub>pro</sub>) e da proteína quimérica do domínio do cofator e da protease (NS2B/NS3<sub>pro</sub>). **1kb+.** Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder; **1.** Co-fator NS2B; **2.** Protease NS3<sub>pro</sub>; **3.** Proteína quimérica NS2B/NS3<sub>pro</sub>.

A amostra de DNA obtida da PCR de fusão da quimera NS2B/NS3<sub>pro</sub> purificada, foi submetida à digestão com as endonucleases de restrição BamHI e KpnI, re-purificada e ligada ao plasmídeo pQE-30, digerido com as mesmas endonucleases. A ligação foi transformada na linhagem bacteriana TOP10F' cálcio-competente (tópico 6.3.2). Em seguida, foi utilizada a técnica de palitagem para detecção de plasmídeos recombinantes. A figura 8.2 mostra o perfil eletroforético em gel de agarose dos potenciais clones recombinantes correspondentes a quimera NS2B/NS3<sub>pro</sub>. Pela diferença de peso molecular, quando comparadas com o controle (plasmídeo sem inserto), as colônias identificadas como 1, 4 e 5, indicaram a provável presença de plasmídeos recombinantes. As colônias bacterianas contendo os potenciais plasmídeos recombinantes foram inoculadas em meio de cultura líquido, contendo o antibiótico ampicilina para posterior purificação do DNA plasmidial, através da minipreparação. Depois de extraídos, os plasmídeos foram digeridos com as mesmas endonucleases de restrição utilizadas para clonagem para verificação do

tamanho correto dos insertos (Figura 8.3). Todos os clones apresentaram inserto com tamanho esperado e o clone 5 foi selecionado para a transformação usando a linhagem bacteriana M15 para expressão de proteínas recombinantes. As colônias foram selecionadas em meio seletivo contendo kanamicina e ampicilina e analisadas pela técnica de palitagem (tópico 6.3.2). O clone selecionado foi inoculado em meio líquido seletivo e o plasmídeo extraído pela técnica de minipreparação, para estoques em glicerol.



**Figura 8.2.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da análise de plasmídeos recombinantes pela técnica de palitagem do DNA correspondente a quimera NS2B/NS3<sub>pro</sub> clonada em pQE-30. **CO.** Plasmídeo sem inserto como controle negativo; **1, 4 e 5.** Prováveis plasmídeos recombinantes.

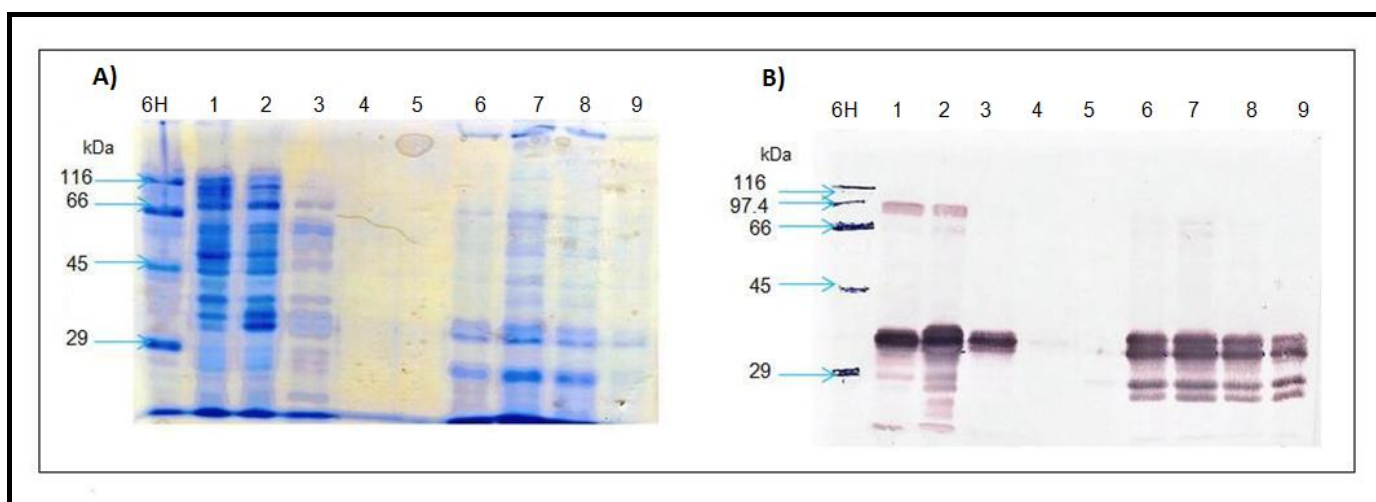


**Figura 8.3.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% para confirmação dos clones recombinantes NS2B/NS3<sub>pro</sub> em pQE-30 através de minipreparação de plasmídeo e digestão dos mesmos. **1kb+.** Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder; **1.** Clone 1; **2.** Clone 4; **3.** Clone 5; **4.** Controle negativo plasmídeo pQE-30 (sem inserto) digerido.

## 8.2 Expressão e purificação da protease quimérica (NS2B/NS3<sub>pro</sub>)

Como descrito nos tópicos 6.3.3 e 6.3.4, a expressão da proteína recombinante NS2B/NS3<sub>pro</sub> foi induzida pela adição de 1mM IPTG ao meio de cultura da linhagem de bactérias M15, e incubação a 30 °C por quatro horas. Como controle negativo culturas não induzidas. Após centrifugação das culturas, os sedimentos celulares foram recuperados em tampão de sonicação e as bactérias lisadas por ultra-som. As frações solúvel e insolúvel foram separadas após centrifugação do homogeneizado. De acordo com resultados obtidos anteriormente (dados não mostrados), a solubilidade da proteína recombinante foi confirmada, portanto, a purificação foi realizada a partir da fração solúvel, através da cromatografia de afinidade utilizando coluna contendo a resina de íons cobalto. A purificação era realizada em ambiente refrigerado a 4 °C, para diminuir a atividade

de auto-clivagem da protease, uma vez que não se utilizou inibidores de protease. Os tampões utilizados foram selecionados pelas características não desnaturantes, como pH e concentrações de sal praticamente neutras, a fim de criar um ambiente fisiológico para a atividade da enzima. Após a passagem do extrato solúvel pela coluna, a resina era lavada com o tampão de lavagem e a eluição da proteína recombinante era feita através da adição do tampão de eluição. Alíquotas de todas as etapas do processo de obtenção da proteína recombinante, foram coletadas e submetidas à eletroforese em géis SDS-PAGE 13%. Após a separação das proteínas, o gel foi corado com *GelCode Blue Stain* (Figura 8.4A). A identidade da amostra foi determinada pela técnica de *Western Blot*, utilizando um anticorpo policlonal contra febre amarela (Figura 8.4B). A proteína expressa apresentou a massa molecular esperada, de aproximadamente 30kDa. As quatro alíquotas de amostras da proteína eluídas da coluna de purificação foram enviados ao Prof. Dr. Luiz Juliano, da Escola Paulista de Medicina, para testes de atividade catalítica utilizando substratos sintéticos, assunto detalhado no tópico 8.4.

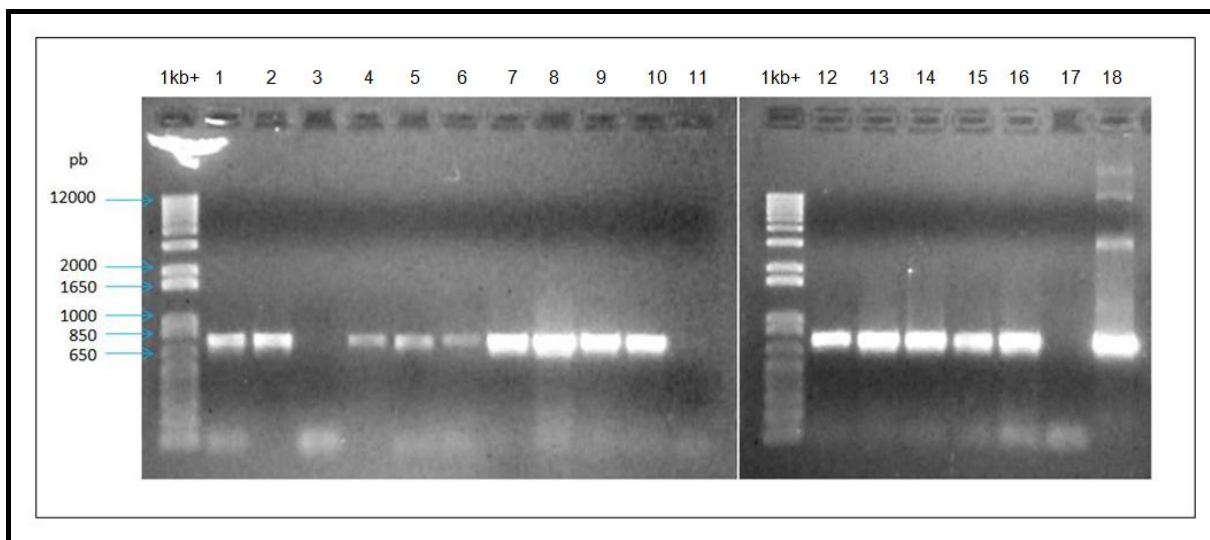


**Figura 8.4.** Análise da expressão e purificação por cromatografia de afinidade da protease NS2B/NS3<sub>pro</sub>. **A.** Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 13% corado com *GelCode Blue Stain* das etapas de purificação da serina protease do VFA; **B.** *Western-blot* reagido com anticorpo policlonal contra VFA. **6H.** Padrão de peso molecular 6H; **1.** Amostra não induzida com 1mM IPTG; **2.** Amostra induzida com 1mM IPTG; **3.** Fração não ligada à resina; **4.** Alíquota do lavado da coluna; **5.** Alíquota das frações eluídas 1; **6.** Eluída 2; **7.** Eluída 3; **8.** Eeluída 4; **9.** Amostra da resina após a eluição da proteína recombinante.

### 8.3 Mutagênese do sitio ativo da protease quimérica (NS2B/NS3<sub>pro</sub>)

Como citado no tópico 6.3.5, a atividade catalítica da protease é formada pela tríade catalítica dos aminoácidos His<sub>53</sub>, Asp<sub>77</sub> e Ser<sub>138</sub> de VFA (CHAMBERS *et al.*, 1990b) e a partir da geração de uma protease mutante, ou seja, inativa, é possível excluir possíveis contaminações com proteases bacterianas, que pudessem eventualmente interferir nos ensaios de atividade da protease recombinante.

A minipreparação clone 5 serviu de molde para a reação de PCR na qual foram utilizados oligonucleotídeos (5 e 6, tabela 6.4 do tópico 6.3.1) contendo uma mutação que alterava o resíduo Ser<sub>138</sub> por Ala<sub>138</sub> da NS3. A reação de PCR foi submetida a um tratamento com a endonuclease DpnI, para digerir o molde do DNA parental, selecionando o DNA sintetizado com a mutação. O plasmídeo mutado e o controle (minipreparação do clone parental) foram usados para transformar a linhagem bacteriana XL1-blue. As colônias resultantes da transformação foram submetidas a uma PCR de colônia para seleção de clones recombinantes, através da amplificação do gene da protease (NS2B/NS3<sub>pro</sub>) utilizando os oligonucleotídeos 1 e 4 da tabela 6.4 (tópico 6.3.1). A figura 8.5 representa o perfil eletroforético da reação, na qual a maioria das colônias indicou a presença do plasmídeo recombinante, pela amplificação do gene da protease, de aproximadamente 740 pares de bases.

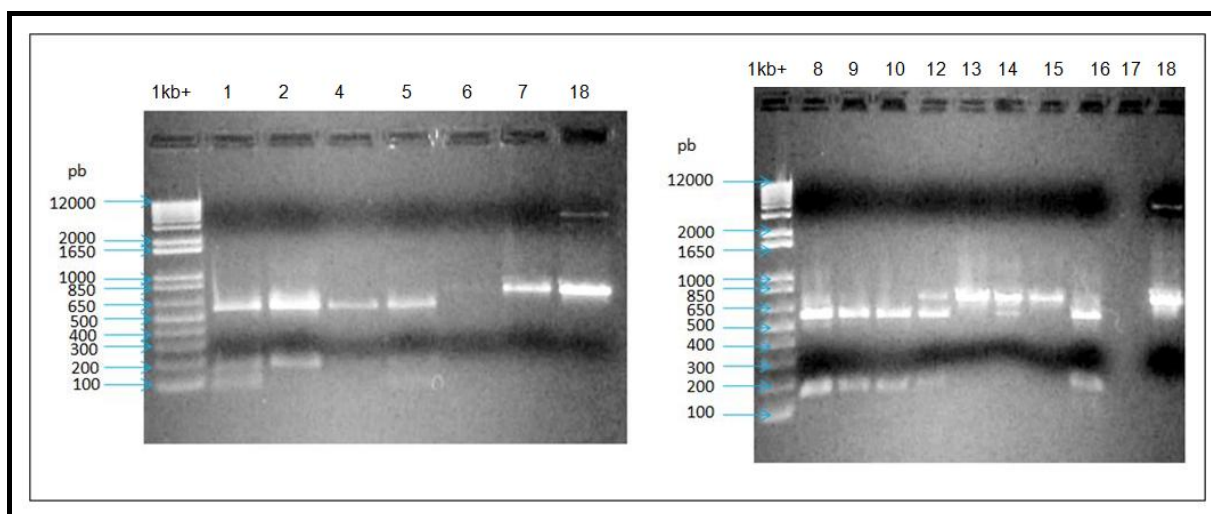


**Figura 8.5.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8 % de reações de PCR do gene correspondente à protease (NS2B/NS3<sub>pro</sub>) para seleção de plasmídeos recombinantes, após o processo de mutagenese sítio dirigida. **1kb+**. Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder; **1, 2, 4-10, 12-16.** Colônias com plasmídeos recombinantes; **3, 11.** Colônias sem plasmídeos recombinantes; **17.** Controle negativo (água); **18.** Controle positivo (clone 5)

Os produtos da reação de PCR em que a amplificação foi positiva, ou seja, das colônias 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16 e 18 (clone não mutagenizado controle), foram tratados com a endonuclease PstI, para selecionar os clones recombinantes que apresentavam a mutação no gene da protease. Nos genes em que a mutação foi inserida efetivamente houve a criação de um sítio para esta enzima de restrição, ocorrendo assim digestão somente nestas amostras. Através da análise do perfil eletroforético pode-se observar dois padrões de bandas nos produtos digeridos, com aproximadamente 580 e 160 pares de bases, enquanto no controle (18), como não houve digestão, apenas uma banda de aproximadamente 740 pares de bases foi observada (Figura 8.6). A colônia 16, contendo o clone recombinante mutado, e o clone controle foram inoculados em meio de cultura líquido LB contendo ampicilina para a posterior minipreparação dos plasmídeos. Os plasmídeos purificados foram usados para transformar a linhagem bacteriana M15, para expressão das proteases selvagem e mutante. A purificação foi realizada como descrito anteriormente. Alíquotas de todas as etapas, como indução (juntamente com o controle não induzido), da fração que não se ligou à resina, do lavado, e das amostras eluídas (1 a 4) e do material que permaneceu aderido à resina, foram coletadas e submetidas à eletroforese em géis SDS-PAGE 13%. Posteriormente, o

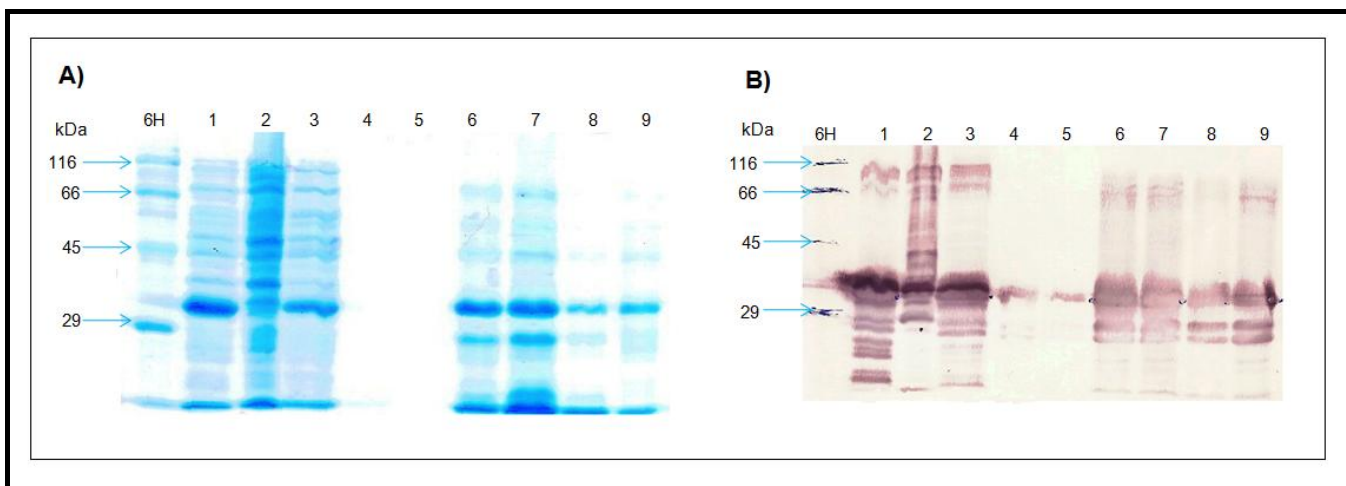
gel foi corado com *GelCode Blue Stain* (Figura 8.4 e 8.7A) e a identidade das proteínas foi analisada através da técnica de *Western-Blot*, utilizando um anticorpo policlonal contra febre amarela (Figura 8.4 e 8.7B). As proteínas apresentavam a massa molecular esperada, de aproximadamente 30kDa e enviadas para o Dr. Luiz Juliano da Escola Paulista de Medicina, para análise funcional das mesmas, descrito no tópico 8.4.

O DNA dos plasmídeos nativo e mutante foram seqüenciadas e através do alinhamento (BLAST) com a sequência da cepa vacinal de febre amarela 17DD, foi observado que as proteases recombinantes apresentam três mutações não sinônimas, porém nenhuma delas localizada na tríade catalítica (His<sub>53</sub>, Asp<sub>77</sub>, Ser<sub>138</sub>. Ressaltando que, a protease recombinante mutante apresenta a mutação inserida, trocando a Ser<sub>138</sub> por alanina.



**Figura 8.6.** Perfil eletroforético em gel de agarose 0.8 % para seleção de clones recombinantes contendo a mutação no sítio catalítico da protease (NS2B/NS3<sub>pro</sub>), após a digestão com a endonuclease PstI. **1kb+**. Marcador de peso molecular 1 kb plus DNA ladder; Colônias **1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 12 e 16** com plasmídeos recombinantes mutados (houve digestão). Colônias **7, 13, 14, 15** plasmídeos sem mutação (não houve digestão). **18.** Controle negativo (clone parental).





**Figura 8.7.** Análise da expressão e purificação por cromatografia de afinidade da protease NS2B/NS3<sub>pro</sub> mutante. **A.** Perfil eletroforético da protease em gel SDS-PAGE 13% corado com *GelCode Blue Stain*; **B.** *Western-blot* reagido com anticorpo policlonal contra VFA. **6H.** Padrão de peso molecular 6H; **1.** amostra induzida com 1mM IPTG; **2.** Amostra não induzida; **3.** Fração não ligada à resina; **4.** Amostra de tampão de lavagem da resina; **5.** Fração eluída 1; **6.** Fração eluída 2; **7.** Fração eluída 3; **8.** Fração eluída 4; **9.** amostra do material aderido a resina.

#### 8.4 Análise funcional da serina protease (NS2B/NS3<sub>pro</sub>) do vírus de febre amarela

Em colaboração com o grupo do Dr. Luiz Juliano Neto, da Escola Paulista de Medicina, peptídeos sintéticos foram desenhados, com base nos sítios de clivagem da poliproteína viral de febre amarela, e utilizados como substratos para análise funcional da protease NS2B/NS3<sub>pro</sub> (Tabela 8.1). A figura 8.8 mostra a atividade relativa da hidrólise de substratos sintéticos com dois ou três aminoácidos básicos. A protease mutante não apresentou atividade enquanto a taxa da atividade relativa da protease funcional foi considerada normal. Outros ensaios serão realizados com novos peptídeos sintéticos e potenciais inibidores da protease.

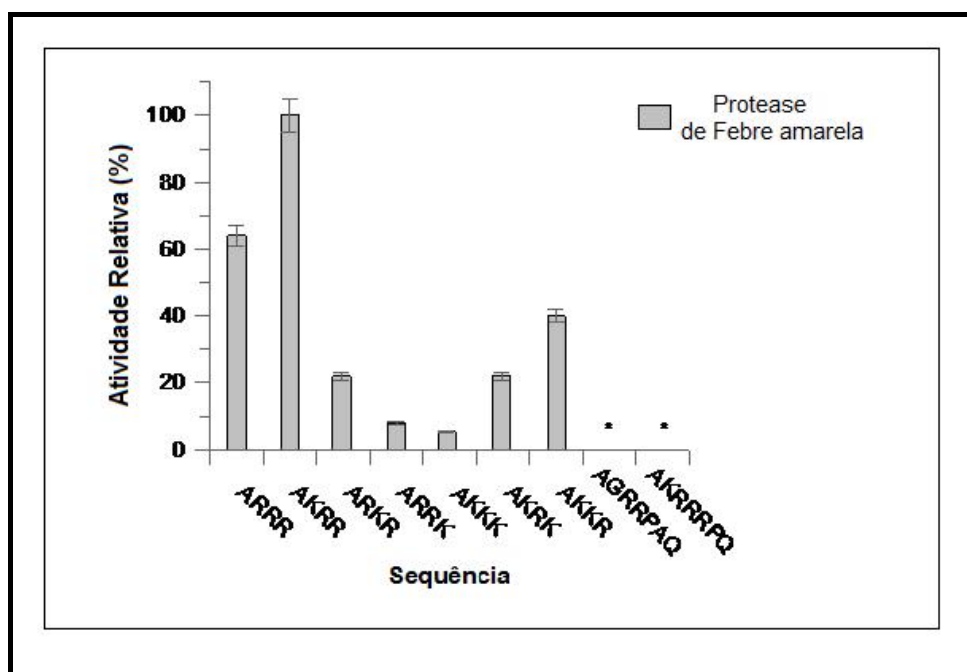


**Tabela 8.1.** Atividade relativa da hidrólise de substratos sintéticos, baseados em sítios de clivagem da poliproteína viral da febre amarela, pela protease NS2B/NS3<sub>pro</sub>.

Peptídeo	Sequência	Região da poliproteína	Atividade relativa (porcentagem) da protease NS2B/NS3 <sub>pro</sub> *
1	RIFGRR↓SIPVNEQ	NS2A/NS2B	20
2	VRGARR↓SGDVLWQ	NS2B/NS3	28
3	FAEGRR↓GAAEVLQ	NS3/NS4	10
4	MKTGRR↓GSANGKQ	NS4B/NS5	18

\* Atividades plotadas em porcentagem relativa, assumindo que a maior eficiência catalítica é de 100%.

↓ Sítios de clivagem



**Figura 8.8.** Atividade relativa da hidrólise de substratos sintéticos de dois ou três aminoácidos básicos, pela protease NS2B/NS3<sub>pro</sub>.

## 9. DISCUSSÃO

### 9.1 Proteínas Recombinantes de Dengue

Desde sua re-introdução no país em 1986, mais de quatro milhões de casos de dengue foram notificados. Além de representar um grave problema para a saúde pública no Brasil, vários outros fatores contribuem para o agravamento da situação, tais como: quadros clínicos que podem ser confundidos com outras doenças infecciosas, a rápida progressão para formas graves da doença, e a ausência de vacinas aprovadas ou drogas antivirais. Portanto, o desenvolvimento de um diagnóstico laboratorial preciso, de baixo custo e precoce, para a detecção de infecções devido aos DENV, é essencial para um manejo clínico apropriado do paciente, assim como para direcionar medidas de vigilância epidemiológica. Considerando esta necessidade, decidimos investir no desenvolvimento de antígenos recombinantes visando a produção de um kit de diagnóstico sorológico para dengue no formato ELISA.

Para escolha dos antígenos recombinantes, nos baseamos em algumas das proteínas virais que desencadeiam uma resposta imune tanto em camundongos como humanos, após a infecção por flavivirus. O principal alvo de anticorpos neutralizantes é a proteína de envelope (E), que contém mais de 12 epítomos distintos em sua superfície já identificados (PINCUS *et al.*, 1992; ROEHRIG; BOLIN; KELLY, 1998; CRILL; CHANG, 2004). Estes epítomos são capazes de licitar anticorpos potencialmente capazes de promover diferentes graus de neutralização *in vitro* e eficácia *in vivo* (ROEHRIG; BOLIN; KELLY, 1998; CRILL; CHANG, 2004). Estudos recentes revelam que a resposta imune humoral humana contra infecções por flavivirus é dirigida para determinantes antigênicos localizados próximo ao peptídeo de fusão, localizado no domínio II da proteína E (THROSBY *et al.*, 2006). Anticorpos específicos contra as proteínas pré-membrana (prM) e a não estrutural 1 (NS1) também já foram observados em soro de pacientes com dengue (VAZQUEZ *et al.*, 2002; SHU *et al.*, 2000). Dados na literatura mostram que anticorpos contra a proteína prM são capazes de proteger camundongos contra infecção pelo vírus da dengue (KAUFMAN *et al.*, 1989), assim como a imunização passiva com anticorpos monoclonais anti-NS1, protege camundongos frente à infecção com flavivirus homólogos (MACKENZIE; JONES; YOUNG, 1996; SCHLESINGER; BRANDRISS; WALSH, 1987; ZHANG *et al.*, 1988; HENCHAL; HENCHAL; THAISOMBOONSUK,

1987; BRAY *et al.*, 1989; CANE; GOULD, 1988). Em adição, na maioria dos hospedeiros humanos e murinos infectados por flavivirus, uma vigorosa resposta humoral e celular é observada contra a proteína não estrutural 3 (NS3) (BRINTON *et al.*, 1998). Portanto, estas proteínas, com propriedades imunogênicas, tornam-se alvos para o desenvolvimento de vacinas e testes de diagnóstico.

O sistema para expressão de proteínas heterólogas em células de *Drosophila* oferece diversas vantagens, quando comparado com sistemas procarióticos e outros sistemas eucarióticos. Ao contrário de sistemas procarióticos, realiza modificações pós-traducionais como glicosilação semelhante à células de mamíferos, passo necessário para se obter as glicoproteínas prM, E e NS1 dos DENV mais próximas a sua forma nativa. Quando comparado às células de mamíferos, as células S2 de *Drosophila* apresentam crescimento celular mais rápido, não há necessidade de meios de cultura que utilizam suplementos caros e não necessita de CO<sub>2</sub>, ou controle de pH para incubação. Outro sistema que também utiliza células de inseto para expressão de proteínas heterólogas, o sistema de baculovírus, não permite um bioprocessamento contínuo devido à infecção do vírus e conseqüente lise celular. Em contrapartida, o sistema de expressão em células de *Drosophila*, permite a obtenção de linhagens estáveis, com a geração de até 1000 cópias do gene de interesse por célula (KIRKPATRICK *et al.*, 1995) e conseqüentemente, um bioprocessamento contínuo, e a expressão da proteína de interesse em larga escala. Além disso, apresenta promotores eficientes, além da sequência sinal BiP, que possibilita a secreção da proteína de interesse no meio de cultura celular. Diversas proteínas, como anticorpos (JOHANSSON *et al.*, 2007; KIRKPATRICK *et al.*, 1995), inibidores (LEE *et al.*, 2007; JEON *et al.*, 2003; VALLE *et al.*, 2001), receptores (PERRET *et al.*, 2003; MILLAR *et al.*, 1995), enzimas (BANKS; HUA; ADANG, 2003; HILL; BRENNAN; BIRCH, 2001), fatores de crescimento (LEE *et al.*, 2000) e antígenos virais (YOKOMIZO *et al.*, 2007; JORGE *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2007; LIEBERMAN *et al.*, 2007), foram expressas em células de *Drosophila*, sendo propriamente processadas e biologicamente ativas. Com relação aos DENV, a expressão do ectodomínio das proteínas E, utilizando o sistema de células S2 de *Drosophila*, foi descrito por CUZZUBBO *et al.* (2001), que produziram com sucesso as proteínas recombinantes usadas como antígenos em kits de diagnóstico comercializados em todo mundo pela empresa PanBio. Outros autores descrevem a produção e o processamento correto de proteínas de DENV que vem

sendo empregadas como subunidade para desenvolvimento de vacinas (PUTNAK *et al.*, 2005) e como modelo para determinação estrutural do ectodomínio de DENV-2 e DENV-1, através de cristalografia (NAYAK *et al.*, 2009; MODIS *et al.*, 2004).

A grande parte dos trabalhos realizados para expressão de proteínas heterólogas em células de *Drosophila* utiliza, com sucesso, os plasmídeos disponibilizados pela empresa Invitrogen, sejam eles modificados ou não, como por exemplo, pMT/BiP/V5-His, pMT/BiP/V5-His-GFP, pMT/V5-His e pAc5.1/V5-His (NAYAK *et al.*, 2009; JOHANSSON *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2008; LEHR *et al.*, 2000; SHIN; CHA, 2000; ZHANG *et al.*, 2007). Outra empresa que desenvolveu sistema semelhante para expressão de proteínas E de *flavivirus*, como DENV, JEV, hepatite C e WNV foi a *Hawaii Biotech*. Porém, pouco se sabe sobre o tipo de plasmídeos e estratégias adotadas pela empresa. Os resultados mostram apenas que as proteínas expressas são glicosiladas apropriadamente, e mantém a conformação nativa, determinada por cristalografia e reação com anticorpos monoclonais sensíveis à conformação (CUZZUBBO *et al.*, 2001; MODIS *et al.*, 2003, 2004 e 2005; LIEBERMAN *et al.*, 2007).

A primeira etapa deste trabalho foi a amplificação por PCR dos genes de interesse de DENV-1, -2, -3 e -4 para clonagem em no plasmídeo pMT/BiP/V5-His. Todos os clones obtidos foram seqüenciados e apenas aqueles em fase de leitura correta foram utilizados. São eles: clones para expressão das proteínas quiméricas prM/ E<sub>Δ100</sub> de DENV-2 (dois) e DENV-3 (um), para expressão das proteínas de envelope E<sub>Δ100</sub> de DENV-1 (um), DENV-2 (dois), DENV-3 (um) e DENV-4 (um) e para expressão das proteínas não-estrutural 1, NS1, de DENV-1 (dois), DENV-2 (um) e DENV-3 (um). Primeiramente, foram realizados experimentos em pequena escala para a padronização da técnica. Após a transfecção e expressão de proteínas em culturas de células S2, verificamos que não era possível a visualização direta das proteínas recombinantes em géis de SDS-PAGE corados com azul de Comassie ou *GelCode Blue Stain*, nem mesmo o controle positivo, a proteína GFP. A detecção das proteínas só era possível através de ensaios de *Western-Blot* com imunomarcação com anticorpo anti-DENV específico. No entanto, a visualização das bandas específicas não era clara, ao contrário de quando o anticorpo monoclonal contra a etiqueta V5 (presente na região carboxi-terminal das proteínas recombinantes) era empregado. Lieberman *et al.* (2007) demonstram uma expressão evidente da proteína a partir do extrato celular para expressão das

proteínas E e NS1 de WNV em géis SDS-PAGE corados com Comassie blue, porém, somente após o processo de co-transfecção, utilizando meio de cultivo sem soro ou após etapas de purificação e enriquecimento das proteínas. Para os ensaios de *westerns-blot*s, estes autores utilizaram o anticorpo policlonal anti-WNV para detecção da proteína de envelope enquanto para a detecção de NS1 foi utilizado um anticorpo monoclonal, denominado de 7E11, e o rendimento das proteínas expressas foi estimado entre 10 e 25 mg/L de cultura. Teoricamente, após o processo de co-transfecção aumenta-se a população de células que contém plasmídeos recombinantes (devido ao processo de seleção com antibiótico) e consequentemente aumenta o rendimento da expressão de proteínas heterólogas, como observamos nos ensaios de *western-blot* pós co-transfecção, no qual a visualização com anticorpos policlonais anti-dengue foi mais intensa. Entretanto, o rendimento da proteína recuperada após a purificação ainda é baixo (entre 1 e 4 µg/mL), quando comparada com dados de literatura, aonde são relatados valores entre 5 e 70 mg de proteína recombinante/L de cultura (LIEBERMAN *et al.*, 2007; JOHANSSON *et al.*, 2007; LEHR *et al.*, 2000; BENTING *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2007 e 2009). Provavelmente, a suplementação do meio de cultura, como o soro fetal bovino (SFB) esteja interferindo na obtenção da proteína-alvo, como indicado por Galesi, Pereira e Moraes (2007).

Santos *et al.* (2007) relatam que são diversos os parâmetros que devem ser considerados para o aperfeiçoamento no processo de expressão do gene de interesse. O primeiro, além da estratégia para a construção do vetor recombinante, é a metodologia de transfecção eficiente, necessária para prover uma alta taxa de células transfectadas. Em seguida, devem ser estabelecidos parâmetros de indução do promotor da metalotioneína, otimizando a concentração de CuSO<sub>4</sub>.

Assim, com o intuito de obtermos um melhor rendimento na expressão de proteínas, outras estratégias de clonagem foram desenhadas. Todas as estratégias alternativas foram desenvolvidas para DENV-3 (pelo fato de termos na soroteca do laboratório um maior numero de amostras de soro positivas para DENV-3) e envolveram a utilização de outros plasmídeos como pMT/V5-His e pMT/V5-His-TOPO. Entretanto, foram obtidos apenas dois clones em fase de leitura correta com estas diferentes estratégias, um clone da proteína de envelope, o E<sub>Δ100</sub><sup>c/STOP</sup> 38 (clonado em pMT/BiP/V5-His) e um clone da proteína não-estrutural 1, denominado ssNS1<sup>c/STOP</sup> 17 (clonado em pMT/V5-His-TOPO) de DENV-3. Como ambos não

contem a seqüência de aminoácidos que codifica o epítopo V5 (Gly, Lys, Pro, Ile, Pro, Asn, Pro, Leu, Leu, Gly, Leu, Asp, Ser, Thr), os ensaios *Western-Blot* foram revelados com o anticorpo policlonal específico, anti-DENV3. Comparando os clones  $E_{\Delta 100}^{c/STOP}$  38 e  $E_{\Delta 100}$  8 (que não inclui o códon de terminação de tradução), ambos de DENV-3, pode-se perceber que a expressão de  $E_{\Delta 100}^{c/STOP}$  38 foi mais evidente, principalmente na fração do sobrenadante. A presença da etiqueta V5, presente no plasmídeo sem o códon de terminação de tradução, não deve ter tido influência na diferença de expressão da proteína, pois Nayak *et al.* (2009) utilizaram o plasmídeo pMT/BiP/V5-His para expressão da proteína de envelope de DENV-1 e obtiveram quantidades suficientes para realizar ensaios de cristalografia. Provavelmente, diferenças de conformação podem ter ocorrido devido à mutações geradas.

O passo seguinte foi determinar a metodologia de transfecção, passo crucial na expressão de proteínas recombinantes. Shin e Cha (2002) indicam que, apesar de ser altamente usado e recomendado a transfecção por fosfato de cálcio, desenvolvido por Graham e Van der Eb (1973), o método usando lipossomos mostrou ser eficiente em grande variedade de células, inclusive linhagens de *Drosophila* (MALONE; FELGNER; VERMA, 1989; PARK *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2007). A fim de aumentar o rendimento na expressão de proteínas recombinantes, resolvemos analisar a quantidade de células transfectadas que estavam efetivamente expressando a proteína quimérica prM/ $E_{\Delta 100}$  6 de DENV-3, através de citometria de fluxo. Para esta análise, utilizamos três diferentes metodologias de transfecção, com os reagentes Cellfectina<sup>TM</sup>, Lipofectina<sup>TM</sup>, além do método com fosfato de cálcio. Entre os reagentes Cellfectina<sup>TM</sup> e Lipofectina<sup>TM</sup>, este último parece ser mais eficiente pois há uma maior taxa de células expressando a proteína (aproximadamente 13% contra 7%). Entretanto, não foi possível uma comparação direta destes dois métodos com o de fosfato de cálcio, pois a quantidade de DNA recomendada e utilizada neste último é 10 vezes maior do que a utilizada nos outros métodos. Em contrapartida, foi o método escolhido, já que 62.2% das células transfectadas com fosfato de cálcio expressavam a proteína recombinante.

Dados da literatura mostram que diversas concentrações de  $CuSO_4$  foram utilizadas para induzir a expressão de proteínas recombinantes em células S2 (SANTOS *et al.*, 2007; BENTING *et al.*, 2000; LEHR *et al.*, 2000). Santos *et al.* (2007), relataram que o uso de 700  $\mu M$  de  $CuSO_4$ , era capaz de induzir a expressão de EGFP em 80% das células co-transfectadas, enquanto 500  $\mu M$  induziam

expressão em apenas 60% das células. Baseado nestes estudos foram testadas três diferentes concentrações de  $\text{CuSO}_4$ : 500, 700 e 1000  $\mu\text{M}$ , a fim de otimizar o rendimento na expressão de proteínas recombinantes. Os resultados obtidos foram semelhantes para concentrações de 500 e 700  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ , com aproximadamente 50% das células expressando a proteína. Quando foi utilizada a concentração de 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ , houve uma redução de 10% nas células que expressavam a proteína (40% de células positivas), indicando que altas concentrações de  $\text{CuSO}_4$  podem ser tóxicas às células.

Após as etapas de padronização descritas acima, realizamos a expressão das proteínas de envelope dos clones DENV-1  $E_{\Delta 100}$  17, DENV-2  $E_{\Delta 100}$  6 e DENV-4  $E_{\Delta 100}$  2 além da proteína quimérica DENV-3 prM/ $E_{\Delta 100}$  6 e o rendimento, após purificação em colunas de afinidade à metais (cobalto) foi de 1; 1,5; 4 e 4,2  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Como discutido anteriormente, a presença do soro fetal bovino pode afetar o processo de purificação de proteínas, obtendo-se um baixo rendimento na recuperação das mesmas devido a um excesso de albumina que poderia estar saturando a resina ou ainda interferindo com a ligação da proteína de interesse à resina. Outro fator que pode estar relacionado ao baixo rendimento na obtenção das proteínas pode ser devido as perdas durante os vários processos de purificação realizados, como as etapas de diálise para eliminar a solução de  $\text{CuSO}_4$ , que compete pela resina de cobalto utilizada para purificar as proteínas. Lehr *et al.* (2000), desenvolveram um protocolo para purificação de proteínas com cauda de histidina expressas em células de *Drosophila* em que substituíram as resinas com afinidade à metais, como *Ni-NTA*, por resinas de sefarose queladas com ácido iminoacético tri-dentado, permitindo a purificação de proteínas diretamente do meio de cultura contendo íons de cobre. Os complexos proteína-cobre são retidos na resina de sefarose enquanto íons de cobre livres são lavados, permitindo uma purificação eficiente da proteína. Cuzzubbo *et al.* (2001), Modis *et al.* (2003, 2004 e 2005) e Lieberman *et al.* (2007) purificaram as proteínas de envelope de DENV e WNV por cromatografia de imunoafinidade, utilizando o anticorpo monoclonal flavivirus grupo específico 4G2. Em contrapartida, Nayak *et al.* (2009) expressaram a proteína de envelope para cristalografia e purificaram utilizando outros métodos, como troca catiônica e exclusão por tamanho. Visando aperfeiçoar o protocolo de purificação pretendemos utilizar metodologia semelhante para obtenção das proteínas prM/ $E_{\Delta 100}$  de DENV-2 e NS1 de DENV-1, -2 e -3, através de colunas de

afinidade com anticorpos monoclonais anti-dengue que estamos produzindo em nosso laboratório.

Recentemente, foram avaliados nove testes comerciais de diagnóstico para detecção de IgM em infecções agudas de dengue. Cinco eram do formato ELISA e quatro eram testes rápidos (cromatografia de fluxo lateral) (HUNSPERGER *et al.*, 2009). Dos testes avaliados, os testes rápidos da Panbio (Austrália) e o da Standard Diagnostics (Coréia do Sul), além do teste tipo ELISA convencional da Panbio, utilizam proteínas recombinantes como antígeno. O uso de partículas virais completas exige o cultivo dos vírus para produção de antígeno e a inativação das partículas virais infecciosas acarretando maiores custos. Como a proteína E é o principal componente antigênico viral, é capaz de substituir partículas virais inteiras em testes sorológicos. Diversos sistemas e vetores já foram utilizados para expressão da proteína de envelope recombinante, como: *E. coli* (MASON *et al.*, 1990; SUGRUE *et al.*, 1997), vírus vaccínia recombinante (BRAY *et al.*, 1989; FONSECA *et al.*, 1994), baculovírus (MAKINO *et al.*, 1991; PUTNAK *et al.*, 1991; FEIGHNY; BURROUS; PUTNAK, 1994; DELENDÁ *et al.*, 1994; DELENDÁ; FRENKIEL; DEUBEL, 1994), levedura (SUGRUE *et al.*, 1997) e células de mamífero (KONISHI *et al.*, 2000). As proteínas obtidas nos diversos sistemas foram capazes de gerar respostas de anticorpos neutralizantes, anticorpos inibidores de hemaglutinação (HI), assim como resposta imune em animais. O kit MAC-ELISA comercializado pela empresa Panbio, avaliado no trabalho de HUNSPERGER *et al.*, (2009) apresentou a maior média de sensibilidade (99%) e especificidade (84.4%), quando comparado com o padrão de referência, ELISAs utilizados pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) e pelo Instituto de Pesquisa de Ciência Médica das Forças Armadas (AFRIMS). Os testes de diagnóstico rápido da Panbio (Dengue Duo Cassete) e da Standard Diagnostics (SD dengue IgG/IgM), apresentaram as maiores taxas de especificidade, 90.6% e 90.0%, respectivamente, e diferentes valores de sensibilidade, 77.8% e 60.9%, respectivamente.

Assim como a proteína de envelope, a quimera prM/E recombinante também pode ser um potencial alvo para o sorodiagnóstico, devido à produção de partículas virais não infecciosas vazias, chamadas de VLPs (*virus-like particles*). Durante a infecção natural dos flavivirus, VLPs são produzidas juntamente com virions maduros e infectantes, e demonstram propriedades estruturais e físico-químicas similares aos virions maduros (PURDY; CHANG, 2005). Já foram descritos



plasmídeos que secretam VLPs de JEV, WNV e DENV em culturas de células, inclusive na linhagem S2 de *Drosophila* (ZHANG *et al.*, 2007), e que conferem proteção em camundongos, assim como produção de anticorpos neutralizantes (CHANG *et al.* 2001 e 2003; DAVIS *et al.*, 2001). Inclusive, ensaios imunoenzimáticos para diagnóstico de JEV e WNV, utilizando como antígenos as VLPs, foram descritos com sucesso (JAASKELAINEN *et al.*, 2003; HOGREFE *et al.*, 2004).

A etapa seguinte de nosso trabalho foi a avaliação do desempenho dos antígenos recombinantes em testes ELISA. Iniciamos com a padronização da metodologia para a detecção de anticorpos da classe IgG em amostras de soro de pacientes através de ensaios ELISA indireto (os antígenos recombinantes eram imobilizados diretamente na placa). Embora os resultados sejam preliminares, os testes foram capazes de detectar anticorpos IgG específicos para dengue. No momento estamos incluindo um numero maior de amostras de soro, e também soros negativos para dengue, e positivos para outras flavivirose. Em outro formato de teste ELISA, do tipo sanduíche, dois soros positivos para IgM anti-dengue foram utilizados para sensibilização da placa e posteriormente foi acrescentado o antígeno, a proteína recombinante prM/E $\Delta_{100}$  de DENV-3 em diferentes diluições. Após as incubações, lavagens e posterior leitura, foi determinado que não houve especificidade na reação do antígeno com os soros humanos IgM positivos.

Idealmente, como demonstrado no trabalho de Hunsperger *et al.* (2009) um painel de soros para validação de testes diagnósticos para dengue deve incluir amostras de pacientes infectados com os diversos sorotipos de dengue, de infecções primárias e secundárias, soros pareados e com isolamento viral ou PCR positivos. Dentre os soros negativos, devem ser incluídos soros de pacientes sem patologia alguma, de pacientes com doenças febris como malária e hantavirose do Novo Mundo e de pacientes infectados com flavivirus relacionados sendo IgM e IgG positivos, como febre amarela, para que a reatividade cruzada seja mínima. No momento estamos ampliando o painel de soros para a validação dos testes para dengue incluindo todas as amostras preconizadas acima e pretendemos validar os antígenos que produzimos isoladamente ou em conjunto.

Outra proteína alvo indicada para o diagnóstico de dengue é a NS1 identificada como uma glicoproteína altamente conservada entre os DENV. Em células de mamíferos infectadas a NS1 é identificada intracelular, em associação com

membranas da célula assim como em formas hexaméricas secretadas ao meio extracelular (FLAMAND *et al.*, 1999). Young *et al.* (2000) demonstraram altos níveis desta proteína viral no soro de pacientes durante a fase aguda da doença (em alguns casos antes ou concomitante com o aparecimento dos sintomas clínicos), indicando a viabilidade de utilizar a secreção desta proteína no soro de pacientes como um marcador de viremia e no diagnóstico precoce. Recentemente, foram desenvolvidos, testes ELISA para detecção deste antígeno no soro de indivíduos com suspeita de dengue, para o diagnóstico precoce durante a fase aguda, tanto na infecção primária como secundária (ALCON *et al.*, 2002). Ainda, Libraty *et al.* (2002) correlacionaram níveis de NS1 nos plasma de pacientes com a viremia e observaram que os níveis de NS1 eram maiores em pacientes com febre hemorrágica do que em pacientes com febre por dengue, tornando-se esta proteína também aplicável para prognóstico de gravidade de dengue.

É importante salientar que os testes ELISA para captura do antígeno NS1 são complementares aos outros métodos de diagnóstico, como RT-PCR, técnica usada para diagnóstico precoce durante a infecção do vírus de dengue. Alcon *et al.* (2002) relataram que o antígeno foi detectado mesmo quando o RNA viral foi negativo para RT-PCR. Outros métodos sorológicos tipo ELISA, como MAC-ELISA e ELISA para detecção de IgG também complementam o diagnóstico, devido às diferentes “janelas” imunológicas no curso da doença como o declínio da viremia e o aparecimento de anticorpos das classes IgM e IgG. Na infecção primária, os anticorpos IgM são detectáveis de 3 a 5 dias após o início da febre (e podem persistir de 30 a 60 dias) enquanto os níveis de anticorpo da classe IgG se elevam depois de 9 a 10 dias e permanecem detectáveis pela vida toda do indivíduo (GUBLER, 1996)(Figura 2.2, Introdução). Durante a infecção secundária, os níveis de IgM se elevam mais tardiamente e alcançam valores mais baixos do que numa infecção primária, e os níveis de anticorpos tipo IgG aumentam 1 a 2 dias após o início da febre e alcançam níveis mais altos do que em infecções primárias (GUBLER, 1996). Em contrapartida, o antígeno NS1 tem o mesmo padrão tanto em infecções primárias como secundárias, na qual é detectado no soro de pacientes desde o primeiro dia do início de febre até o nono dia (ALCON *et al.*, 2002).

Com o intuito de realizarmos um diagnóstico preciso ao longo do curso da infecção por dengue decidimos investir na expressão de diferentes proteínas virais que poderão ser utilizadas de forma unitária ou em conjunto, visando aumentar a

robustez dos ensaios. Foram expressas e caracterizadas, através de ensaios de western-blot as proteínas NS1 de DENV-1, DENV-2 e DENV-3. Atualmente estamos investindo na otimização da expressão e purificação destes antígenos para a produção de anticorpos monoclonais e desta forma eventualmente desenvolver um teste tipo captura deste antígeno viral em soro de pacientes com suspeita de dengue. Em paralelo a aplicabilidade destas proteínas também será avaliada em testes formato ELISA para o diagnóstico de dengue tanto em fase aguda como convalescente.

Alternativamente estamos avaliando a aplicabilidade das proteínas recombinantes expressas em ensaios de imunodeteção em membranas tipo “*dot-blot*”.

O conjunto dos resultados obtidos neste trabalho, embora ainda preliminares, indica que os antígenos recombinantes dos quatro sorotipos de DENV poderão ser utilizados para o desenvolvimento de testes sorológicos em formatos distintos para o diagnóstico da dengue.

## 9.2 Protease de Febre Amarela

Apesar da disponibilidade de uma vacina eficaz, a febre amarela continua sendo uma doença de impacto para saúde pública, atingindo aproximadamente 200.000 pessoas por ano, das quais 30.000 morrem. A patogênese da doença ainda não é completamente compreendida, e não existem tratamentos específicos para pacientes infectados com febre amarela, complicando a conduta clínica. A taxa de fatalidade em casos severos pode chegar a 50%. Como é uma zoonose, sua erradicação é bastante improvável, sendo necessária uma cobertura vacinal eficiente e desenvolvimento de drogas para o tratamento apropriado e específico de pacientes.

Atualmente, estudos estão sendo realizados para o desenvolvimento de antivirais contra flavivirus que possam reduzir a viremia nos estágios iniciais da doença, bloquear a replicação viral ou modular as respostas do hospedeiro para prevenir ou tratar a doença (BRAY, 2008). Algumas proteínas virais são potenciais alvos para desenvolvimento destas drogas, entre elas a protease (NS3<sub>pro</sub>). Os 180 primeiros aminoácidos da NS3 dos flavivirus, juntamente com seu cofator NS2B estão envolvidos no processamento da poliproteína e consequentemente permitindo

a replicação do vírus. Através da expressão em *E. coli* da protease recombinante de flavivirus como DENV, WNV e VFA, foi possível determinar sua especificidade por substratos, parâmetros cinéticos e perfis de peptídeos inibidores de protease (LEUNG *et al.*, 2001; GANESH *et al.*, 2005, LI *et al.*, 2005; LOHR *et al.*, 2007).

Lohr *et al.* (2007), expressaram em sistema procariótico a protease NS3, juntamente com seu cofator NS2B, do VFA, e observaram que esta protease apresentava atividade catalítica, com capacidade de clivar substratos fluorogênicos e sendo inibida por pequenos peptídeos. Com base nestes estudos, resolvemos expressar a NS2B/NS3<sub>pro</sub> do vírus de febre amarela cepa 17 DD e, em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Juliano, da Escola Paulista de Medicina, estudar a atividade catalítica da enzima e eventualmente testar potenciais inibidores. Os estudos de inibição devem ser específicos para a replicação viral, evitando que serina-proteases do hospedeiro sejam afetadas. A proteína foi expressa e caracterizada. A atividade catalítica da proteína foi avaliada e para se excluir possível atividade de proteases bacterianas contaminantes, foi gerada uma proteína com uma mutação Ser<sub>138</sub> por Ala<sub>138</sub> no sítio ativo da enzima, gerando desta forma uma protease inativa.

Os estudos de atividade mostraram que a protease apresentava atividades catalíticas próprias, sem interferência de proteases bacterianas. A taxa da atividade relativa da protease funcional foi considerada normal, porém serão realizados outros testes nos quais serão incluídos outros substratos sintéticos como SSRKRR↓SHDVL<sup>TQ</sup>, SRRSRR↓AIDLPT<sup>Q</sup>, DTSMQK↓TIPIVA<sup>Q</sup>, LSVVAA↓NELGML<sup>Q</sup> e KLAQRR↓VFHGVA<sup>Q</sup>, referentes aos sítios de clivagem na poliproteína nativa nas junções C/prM, prM/M, NS2A<sub>int</sub>, NS3<sub>int</sub> e NS4A/NS4B, respectivamente. Peptídeos inibidores serão sintetizados na EPM pelo grupo do Dr. Luiz Juliano, e testados para verificação se há bloqueio da atividade catalítica. Embora apresentando atividade, verificamos que a protease recombinante apresentava três mutações decorrentes do processo de clonagem. Estas mutações estão sendo reparadas a fim de promover um aumento na atividade catalítica.

## 10. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A possibilidade de se produzir antígenos recombinantes para serem utilizados em testes diagnósticos a fim de se detectar e eventualmente tipar, infecções pelos quatro sorotipos dos vírus dengue representa uma alternativa à importação dos kits atualmente usados no Brasil. Devido às características das proteínas virais com potencial (antigênicas) para serem utilizadas em testes diagnósticos, decidimos utilizar o sistema de expressão em células S2 de *Drosophila*. A implantação deste sistema no laboratório possibilitou a expressão e caracterização das proteínas virais prM/E de DENV-2 e DENV-3, a proteína NS1 de DENV-1, DENV-2 e DENV-3, e a proteína E dos quatro sorotipos. Foram realizados testes em pequena escala para se avaliar a potencialidade destes antígenos recombinantes para detecção de IgM e IgG em soro de pacientes. Os testes para detecção de IgM apresentou reações inespecíficas e atualmente estamos testando novos formatos utilizando os antígenos separadamente ou em combinação. Os testes para detecção de imunoglobulinas de classe G, embora bastante preliminares, forneceram resultados mais satisfatórios.

As próximas etapas do projeto incluem:

Otimização da expressão das proteínas recombinantes através do uso de genes sintéticos com códons otimizados para a expressão em células de *Drosophila*. Com esta abordagem esperamos aumentar o rendimento dos antígenos recombinantes.

Gerar linhagens estáveis de células S2 expressando continuamente as proteínas de interesse.

Padronização dos testes em formato ELISA de captura utilizando os antígenos recombinantes individualmente e em combinação para se tentar aumentar a especificidade dos testes de detecção de IgM (amostras em fase aguda).

Ampliar o painel de soros de paciente em fase convalescente para validar o ensaio de detecção de IgG.

Paralelamente ao estudo de expressão de proteínas para o diagnóstico de dengue, foi obtida a protease recombinante funcional do vírus da febre amarela, assim como o controle da protease mutada no sítio ativo, em sistema de *E. coli*. Esta enzima foi testada quanto à atividade catalítica frente a substratos sintéticos (em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Juliano, da Escola Paulista de Medicina), apresentando atividade com a especificidade esperada. Como perspectiva, a mutação decorrente dos processos de clonagem da proteína nativa será reparada, e novos ensaios com substratos e inibidores serão realizados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCON, S. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p. 376-381, 2002.

ALLISON, S. L. *et al.* Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. **Journal of Virology**, v. 75, p. 4268-4275, 2001.

ALVAREZ, D. E. *et al.* Structural and functional analysis of dengue virus RNA. **Novartis Foundation Symposium**, v. 277, p. 120-132, 2006.

ANANDARAO, R.; *et al.* Recombinant multiepitope protein for early detection of dengue infections. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.13, p. 59-67, 2006.

ASHBURN, P. M.; CRAIG, C.F. Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever with a general consideration of the disease. **Philippine Journal of Science**, v. 2, p. 93–152, 1907.

BANKS, D. J.; HUA, G.; ADANG, M.J. Cloning of a *Heliothis virescens* 110 kDa aminopeptidase N and expression in *Drosophila* S2 cells. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 499-508, 2003.

BARNES, W. M. Plasmid detection and sizing in single colony lysates. **Science**, v. 195, p. 393-394, 1977.

BARRETT, A. D.; HIGGS, S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 209-229, 2007.

BAZAN, J. F.; FLETTERICK, R. J. Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. **Virology**, v. 171, p. 637-639, 1989.

BEASLEY, D. W.; BARRETT, A. D. Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. **Journal of Virology**, v. 76, p. 13097-13100, 2002.

BENTING, J. *et al.* Protein expression in *Drosophila* Schneider cells. **Analytical Biochemistry**, v. 278, p. 59-68, 2000.

BERA, A. K.; KUHN, R. J.; SMITH, J. L. Functional characterization of cis and trans activity of the Flavivirus NS2B-NS3 protease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 12883-12892, 2007.

BHARDWAJ, S *et al.* Biophysical characterization and vector-specific antagonist activity of domain III of the tick-borne flavivirus envelope protein. **Journal of Virology**, v. 75, p. 4002-4007, 2001.

BORBA, L. Desenvolvimento de novos insumos para o diagnóstico sorológico da dengue: antígenos virais nativos e recombinantes. Dissertação de mestrado, 2004.

BRAY, M. Highly pathogenic RNA viral infections: challenges for antiviral research. **Antiviral Research**, v. 78, p. 1-8, 2008.

BRAY, M. *et al.* Mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing dengue 4 virus structural proteins with or without nonstructural protein NS1 are protected against fatal dengue virus encephalitis. **Journal of Virology**, v. 63, p. 2853-2856, 1989.

BRINKWORTH, R. I. *et al.* Homology model of dengue virus 2 NS3 protease, putative interactions with both substrate and NS2B cofactor. **Journal of General Virology**, v. 80, p.1167-1177, 1999.

BRINTON, M. A.; FERNANDEZ, A. V.; DISPOTO, J. H. The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. **Virology**, v. 153, p. 113-121, 1986.

BRINTON, M. A. *et al.* Immune mediated and inherited defences against flaviviruses. **Clinical and Diagnostic Virology**, v. 1998.

BUNCH, T. A.; GRINBLAT, Y.; GOLDSTEIN, L. S. B. Characterization and use of the *Drosophila* metallothionein promoter in cultured *Drosophila melanogaster* cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 1043-1061, 1988.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, p. 23-39, 2002.



CALLAHAN, J. D. *et al.* Development and evaluation of serotype and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4119-4124, 2001.

CANE, P. A.; GOULD, E. A. Reduction of yellow fever virus mouse neurovirulence by immunization with a bacterially synthesized non-structural protein (NS1) fragment. **The Journal of General Virology**, v. 69, p. 1241-1246, 1988.

CARDOSA, M. J. *et al.* IgM capture ELISA for detection of IgM antibodies to dengue virus: comparison of 2 formats using hemagglutinins and cell culture derived antigens. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 23, p. 726-729, 1992.

CHAMBERS, T. J.; MONATH, T.P. **Advances in Virus Research, The Flaviviruses: Detection, Diagnosis and Vaccine Development**, California, 2003.

CHAMBERS, T. J. *et al.* Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 649- 688, 1990a.

CHAMBERS, T. J. *et al.* Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 8898-8902, 1990b.

CHANDLER, A. C.; RICE, L. Observations on the Etiology of Dengue Fever. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 3, p. 233-262, 1923.

CHANG, G. J. *et al.* Flavivirus DNA vaccines: current status and potential. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, p. 272–285, 2001.

CHANG, G. J. *et al.* Enhancing biosynthesis and secretion of premembrane and envelope proteins by the chimeric plasmid of dengue virus type 2 and Japanese encephalitis virus. **Virology**, v. 306, p. 170–180, 2003.

CHEN, C. J. *et al.* RNA protein interactions: Involvement of NS3, NS5, and 3'noncoding regions of Japanese encephalitis virus genomic RNA. **Journal of Virology**, v. 71, p. 3466- 3473, 1997.

CHIU, W. W.; KINNEY, R. M.; DREHER, T. W. Control of translation by the 5'- and

3'-terminal regions of the dengue virus genome. **Journal of Virology**, v. 79, p. 8303-8315, 2005.

CLARKE, D. H.; CASALS, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 7, p. 561-573, 1958.

CLELAND, J. B.; BRADLEY, B.; MCDONALD, W. Further Experiments in the Etiology of Dengue Fever. **The Journal of Hygiene**, v. 18, p. 217, 1919.

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 80, p. 11418-11431, 2006.

CRILL, W. D.; CHANG, G. J. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. **Journal of Virology**, v. 78, p. 13975-13986, 2004.

CUI, T. *et al.* Recombinant NS3 dengue virus type 1 NS3 protein exhibits specific viral RNA binding and NTPase activity regulated by the NS5 protein. **Virology**, v. 246, p. 409-417, 1998.

CUZZUBBO, A. J. *et al.* Comparison of PanBio Dengue Duo IgM and IgG capture ELISA and venture technologies dengue IgM and IgG dot blot. **The Journal of Clinical Virology**, v. 16, p. 135-144, 2000.

CUZZUBBO, A. J. *et al.* Use of recombinant envelope proteins for serological diagnosis of dengue virus infection in an immunocromatographic assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 6, p. 1150-55, 2001.

DAVIS, B. S. *et al.* West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. **Journal of Virology**, v. 75, p. 4040-4047, 2001.

DE SILVA, A. M. *et al.* Serologic evidence for an epizootic dengue virus infecting toque macaques (*Macaca sinica*) at Polonnaruwa, Sri Lanka. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 300-306, 1999.

DELEND, C.; FRENKIEL, M. P.; DEUBEL, V. Protective efficacy in mice of a

secreted form of recombinant dengue-2 virus envelope protein produced in baculovirus infected insect cells. **Archives of Virology**, v. 139, p. 197-207, 1994.

DELEND, C. *et al.* Analysis of C-terminally truncated dengue 2 and dengue 3 virus envelope glycoproteins: processing in insect cells and immunogenic properties in mice. **The Journal of General Virology**, v. 75, p. 1569-1578, 1994.

DEUBEL, V. *et al.* Molecular detection and characterization of yellow fever virus in blood and liver specimens of a non-vaccinated fatal human case. **Journal of Medical Virology**, v. 53, p. 212-217, 1997.

dos SANTOS, F. B. *et al.* Analysis of recombinant dengue virus polypeptides for dengue diagnosis and evaluation of the humoral immune response. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n.2, p. 144-52, 2004.

EDELMAN, R. *et al.* Phase I trial of 16 formulations of a tetravalent live-attenuated dengue vaccine. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, p. 48-60, 2003.

EFFLER, P. V. *et al.* Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. **Emerging infectious diseases**, v. 11, p. 742-749, 2005.

FALGOUT, B.; CHANOCK, R.; LAI, C. J. Proper processing of dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 requires the N-terminal hydrophobic signal sequence and the downstream nonstructural protein NS2a. **Journal of Virology**, v. 63, p. 1852-1860, 1989.

FALGOUT, B. *et al.* Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. **Journal of Virology**, v. 65, p. 2467-75, 1991.

FEIGHNY, R.; BURROUS, J.; PUTNAK, R. Dengue type-2 virus envelope protein made using recombinant baculovirus protects mice against virus challenge. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, p. 322-328, 1994.

FELGNER, P. L. *et al.* Lipofection: A highly efficient, lipidmediated DNA-transfection procedure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, p. 7413-7417, 1987.

FIGUEIREDO, L. T.; SIMÕES, M. C.; CAVALCANTE S. M. Enzyme immunoassay for the detection of dengue IgG and IgM antibodies using infected mosquito cells as

antigen. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 702-707, 1989.

FLAMAND, M. *et al.* Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosilation-dependent fashion. **Journal of Virology**, v. 73, n. 7, 1999.

FONSECA, B. A. *et al.* Recombinant vaccinia viruses co-expressing dengue-1 glycoproteins prM and E induce neutralizing antibodies in mice. **Vaccine**, v. 12, p. 279-285, 1994.

FRANCO, O. History of the Yellow fever in Brazil. **Revista Brasileira de Malariologia e Doencas Tropicais**, v. 21, p. 315-512, 1969.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA) – Sistema de Informações Gerenciais da Funasa (SIGFUNASA), 2003. Disponível em: <http://sis.funasa.gov.br>.

GALES, A. L.; PEREIRA, C. A.; MORAES, A. M. Culture of transgenic *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells in serum-free media based on TC100 basal medium. **Biotechnology Journal**, v. 11, p. 1399-1407, 2007.

GANESH, V. K. *et al.* Identification and characterization of nonsubstrate based inhibitors of the essential dengue and West Nile virus proteases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 257-264, 2005.

GOLLINS, S. W.; PORTERFIELD, J. S. PH-dependent fusion between the flavivirus West-Nile and liposomal model membranes. **Journal of General Virology**, v. 67, p. 157-166, 1986.

GORBALENYA, A. E. *et al.* N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3889-3897, 1989.

GOUVEA, I. E. *et al.* Substrate specificity of recombinant dengue 2 virus NS2B-NS3 protease: influence of natural and unnatural basic amino acids on hydrolysis of synthetic fluorescent substrates. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 457, p. 187–196. 2007.

GRAHAM, F. L.; VAN DER EB, A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. **Virology**, v. 52, p. 456-467, 1973.

GRAHAM, H. The dengue: a study of its pathology and mode of propagation. **Journal of Tropical Medicine**, v. 6, p. 209–214, 1903.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue Hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J. Aedes aegypti and Aedes aegypti-borne disease control in the 1990s: top down or bottom up. Charles Franklin Craig Lecture. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, p. 571-578, 1989.

GUBLER, D. J. The global resurgence of arboviral diseases. **Transactions of the Royal Society of the Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 449-451, 1996.

GUBLER, D. J. Human behaviour and cultural context in disease control. **Tropical Medicine & International Health**, v. 2, p. A1-2, 1997.

GUBLER, D. J. The continuing spread of West Nile virus in the western hemisphere. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 1039-1046, 2007.

GUIRAKHOO, F. *et al.* Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. **Journal of Virology**, v. 75, p. 7290-7304, 2001.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Advances in dengue diagnosis. **Clinical and diagnostic Laboratory Immunology**, v. 3, n. 6, p. 621-7, 1996.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. **Journal of Clinical Virology**, v. 27, p. 1-13, 2003.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Disease**, v. 8, p. 69-80, 2004.

GUZMÁN, M. G. *et al.* Induction of neutralizing antibodies and partial protection from viral challenge in Macaca fascicularis immunized with recombinant dengue 4 virus envelope glycoprotein expressed in Pichia pastoris. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, p. 129-134, 2003.

HALSTEAD, S. B.; O'ROURKE, E. J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes.

I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 146, n.1, p. 201-17, 1977.

HALSTEAD, S. B. *et al.* Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis, 25-27 June 2003, Vienna, Austria. **Vaccine**, v. 23, p. 849-856, 2005.

HAMMON, W. M.; RUDNICK, A.; SATHER, G.E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. **Science**, v. 15, p. 1102-1103, 1960.

HEINZ, F. X.; ALLISON S. L. Structures and mechanisms in flavivirus fusion. **Advances in Virus Research**, v. 55, p. 231-269, 2000.

HEINZ, F. X.; ALLISON, S. L. Flavivirus structure and membrane fusion. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 63-97, 2003.

HENCHAL, E. A.; HENCHAL, L. S.; THAISOMBOONSUK, B. K. Topological mapping of unique epitopes on the dengue-2 virus NS1 protein using monoclonal antibodies. **The Journal of General Virology**, v. 68, p. 845-851, 1987.

HILL, R. M.; BRENNAN, S. O.; BIRCH, N. P. Expression, purification, and functional characterization of the serine protease inhibitor neuroserpin expressed in *Drosophila* S2 cells. **Protein Expression Purification**, v. 22, p. 406-413, 2001.

HOGREFE, W. R. *et al.* Performance of immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme-linked immunosorbent assays using a West Nile virus recombinant antigen (preM/E) for detection of West Nile virus- and other flavivirus-specific antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4641-4648, 2004.

HOLBROOK, M. R.; SHOPE, R. E.; BARRETT, A. D. Use of recombinant E protein domain III-based enzyme-linked immunosorbent assays for differentiation of tickborne encephalitis serocomplex flaviviruses from mosquito -borne flaviviruses. **Journal Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4101-10, 2004.

HOLMES, D. A. *et al.* Comparative analysis of immunoglobulin M (IgM) capture enzyme-linked immunosorbent assay using virus-like particles or virus-infected mouse brain antigens to detect IgM antibody in sera from patients with evident flaviviral infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 3227-3236, 2005.

HOTTA, S. Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 90, p. 1-9, 1952

HUANG, J. L. *et al.* High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. **Journal of Medical Virology**, v. 65, n. 3, p. 553-60, 2001.

HUNSPERGER, E. A. *et al.* Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 436-440, 2009.

INNIS, B. L. *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, p. 418-427, 1989.

JÄÄSKELÄINEN, A. *et al.* Diagnosis of tick-borne encephalitis by a mu-capture immunoglobulin M-enzyme immunoassay based on secreted recombinant antigen produced in insect cells. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4336-4342, 2003.

JACOBS, M. G. *et al.* Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. **The FASEB Journal**, v. 14, p. 1603-1610, 2000.

JAISWAL, S.; KHANNA, N.; SWAMINATHAN, S. High-level expression and onestep purification of recombinant dengue virus type 2 envelope domain III protein in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 33, p.80-91, 2004.

JEON, H. K. *et al.* Functional expression of recombinant tumstatin in stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 185-189, 2003.

JOHANSSON, D. X. *et al.* Efficient expression of recombinant human monoclonal antibodies in *Drosophila* S2 cells. **Journal of Immunological Methods**, v. 318(1-2), p. 37-46, 2007.

JOHNSON, A. J.; GUIRAKHOO, F.; ROEHRIG J. T. The envelope glycoproteins of dengue 1 and dengue 2 viruses grown in mosquito cells differ in their utilization of potential glycosylation sites. **Virology**, v. 203, p. 241-249, 1994.

JONES, C.T. *et al.* Flavivirus capsid is a dimeric alpha-helical protein. **Journal of Virology**, v. 77, p. 7143-7149, 2003.

JORGE, S. A. *et al.* Expression of the hepatitis B virus surface antigen in *Drosophila* S2 cells. **Cytotechnology**, v. 57, p. 51-59, 2008.

KAMER, G.; ARGOS, P. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal, and bacterial viruses. **Nucleic Acids Research**, n. 12, p. 7269-7282, 1984.

KANAI, R. *et al.* Crystal structure of west nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes. **Journal of Virology**, v. 80, p. 11000-11008, 2006.

KAO, C. L. *et al.* Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 38, p. 5-16, 2005.

KAUFMAN, B. M. *et al.* Monoclonal antibodies for dengue virus prM glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, p. 576-580, 1989.

KHROMYKH, A. A.; WESTAWAY, E. G. Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. **Journal of Virology**, v. 71, p. 1497-1505, 1997.

KHROMYKH, A. A.; SEDLAK, P. L.; WESTAWAY, E. G. transComplementation analysis of the flavivirus Kunjin NS5 gene reveals an essential role for translation of its N-terminal half in RNA replication. **Journal of Virology**, v. 73, p. 9247- 9255, 1999.

KHROMYKH, A. A. *et al.* G. Efficient trans-complementation of the flavivirus Kunjin NS5 protein but not of the NS1 protein requires its coexpression with other components of the viral replicase. **Journal of Virology**, v. 73, p. 10272-10280, 1999.

KIDD, I. M.; EMERY, V. C. The use of baculoviruses as expression vectors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, p. 137-159, 1993.

KIERMAYR, S. *et al.* Isolation of capsid protein dimers from the tick-borne encephalitis flavivirus and in vitro assembly of capsid-like particles. **Journal of Virology**, v. 78, p. 8078-8084, 2004.

KIMURA, A. Experimental system of yeasts (*Saccharomyces cerevisiae* and other yeasts): mainly how the new transformation method was developed. **Tanpakushitsu**



**Kakusan Koso**, v. 39, p. 314-320, 1994.

KIRKPATRICK, R. B. *et al.* Heavy chain dimers as well as complete antibodies are efficiently formed and secreted from *Drosophila* via a BiP-mediated pathway. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 270, p. 19800-19805, 1995.

KITCHENER, S. *et al.* Immunogenicity and safety of two live-attenuated tetravalent dengue vaccine formulations in healthy Australian adults. **Vaccine**, v. 24, p. 1238-1241, 2006.

KITTIGUL, L. *et al.* Comparison of dengue virus antigens in sera and peripheral blood mononuclear cells from dengue infected patients. **Asian Pacific Journal Allergy and Immunology**, v. 15, p. 187-191, 1997

KONISHI, E. *et al.* A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice. **Vaccine**, v. 18, p. 1133-1139, 2000.

KOONIN, E. V. Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. **The Journal of General Virology**, n. 74, p. 733-740, 1993.

KORAKA, P. *et al.* Detection of immune-complex-dissociated nonstructural-1 antigen in patients with acute dengue virus infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4154-4159, 2003.

KOURI, G. P. *et al.* Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 67, p. 375-380, 1989.

KÜMMERER, B. M.; RICE, C. M. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. **Journal of Virology**, v. 76, p. 4773-4784, 2002.

KUNO, G.; GÓMEZ, I.; GUBLER, D. J. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. **Journal of Virological Methods**, v. 33, p. 101-113, 1991.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 30, n. 3, p. 545-51, 1992.

LEE, J. M. *et al.* Expression of recombinant erythropoietin in stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 36, p. 348-350, 2000.

LEE, J.M. *et al.* Functional expression of recombinant canstatin in stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. **Protein Expression Purification**, v. 52, p. 258-264, 2007.

LEE, J. M. *et al.* Expression and immunogenicity of recombinant polypeptide VP1 of human hepatitis A virus in stably transformed fruitfly (*Drosophila melanogaster*) Schneider 2 cells. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 53, p. 101-109, 2009.

LEHR, R. V. *et al.* A modified metal-ion affinity chromatography procedure for the purification of histidine-tagged recombinant proteins expressed in *Drosophila* S2 cells. **Protein Expression Purification**, v. 19, p. 362-368, 2000.

LEUNG, D. *et al.* Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of truncated NS2B co-factor, small peptide substrates, and inhibitors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276(49), p.45762-45771, 2001.

LI, H. *et al.* The serine protease and RNA-stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue type 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. **Journal of Virology**, v. 73, p. 3108-16, 1997.

LI, J. *et al.* Functional pro-filing of recombinant NS3 proteases from all four serotypes of dengue virus using tetrapeptide and octapeptide substrate libraries. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 28766–28774, 2005.

LIBRATY, D. H. *et al.* High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1165-1168, 2002.

LIEBERMAN, M. M. *et al.* Preparation and immunogenic properties of a recombinant West Nile subunit vaccine. **Vaccine**, v. 25, p. 414-423, 2007.

LIN, C. *et al.* Cleavage at a novel site in the NS4a region by the yellow fever virus NS2b-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4AAB signalase site. **Journal of Virology**, v. 67, p. 2327-35, 1993.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. **Journal of Virology**, v.73, p. 4611-4621, 1999.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. **Flaviviridae: The viruses and their replication**. In: **D. M. Knipe aPMH, ed. Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, v. 1, p. 991-1041, 2001.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. In: CHAMBERS, T.J. & MONATH, T.P. **Advances in Virus Research, The Flaviviruses: Detection, Diagnosis and Vaccine Development**, California: Elsevier Academic Press, vol. 59, p.235-289, 2003.

LIU, W. J.; CHEN, H. B.; KHROMYKH, A. A. Molecular and functional analyses of Kunjin virus infectious cDNA clones demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. **Journal of Virology**, v. 77, p. 7804-7813, 2003.

LIU, W. J. *et al.* Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. **Journal of Virology**, v. 78, p. 12225-12235, 2004.

LIU, W. J. *et al.* Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. **Journal of Virology**, v. 79, p. 1934-1942, 2005.

LLOYD, W.; THEILER, M.; RICCI N. I. Modification of virulence of yellow fever virus by cultivation in tissues *in vitro*, **The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 22, p. 481–529, 1936.

LOHR, K. *et al.* Yellow fever virus NS3 protease: peptide-inhibition studies. **Journal of General Virology**, v 88, p. 2223–2227, 2007.

LUDOLFS, D. *et al.* Serological Differentiation of Infections with Dengue Virus Serotypes 1 to 4 by Using Recombinant Antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4317-20, 2002.

MA, L. *et al.* Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, p. 3414-3419, 2004.

MACKENZIE, J. M.; JONES, M. K.; YOUNG, P. R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. **Virology**, v. 220, p. 232-240, 1996.

MACKENZIE, J. M. *et al.* Subcellular location and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2a e NS4a. **Virology**. v. 245, p. 203-15, 1998.

MAKINO, Y. *et al.* Potential use of a baculovirus-expressed dengue-4 E protein as a diagnostic antigen in regions endemic for dengue and Japanese encephalitis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, p. 636-43, 1991.

MALAVIGE, G. N. *et al.* Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal**, v. 80, p. 588-601, 2004.

MALONE, R. W.; FELGNER, P. L.; VERMA, I. M. Cationic liposome-mediated RNA transfection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 6077-6081, 1989.

MASON, P. W. *et al.* The antigenic structure of dengue type 1 virus envelope and NS1 proteins expressed in Escherichia coli. **The Journal of General Virology**, v. 71, p. 2107-2114, 1990.

MASON, P. W. *et al.* Japanese encephalitis virus-vaccinia recombinants produce particulate forms of the structural membrane proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection. **Virology**, v. 180, p. 294-305, 1991.

MEN, R. *et al.* Immunization of rhesus monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue type 2 virus challenge. **Vaccine**, v. 18, p. 3113-3122, 2000.

MIAGOSTOVICH, M. P. *et al.* Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. **Journal of Clinical Virology**, v. 14, p. 183-189, 1999.

MILLAR, N. S. *et al.* Functional expression of a cloned *Drosophila* muscarinic acetylcholine receptor in a stable *Drosophila* cell line. **The Journal of Experimental Biology**, v. 198, p. 1843-1850, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - <http://portal.saude.gov.br/>

MODIS, Y. *et al.* A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 6986-6991, 2003.

MODIS, Y. *et al.* Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature** vol. 427, p.313-19, 2004.

MODIS, Y. *et al.* Variable surface epitopes in the crystal structure of dengue virus type 3 envelope glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 79, p. 1223-1231, 2005.

MONATH, T. P. Yellow fever: an update. **The Lancet Infectious diseases** v 1(1), p11-20, 2001.

MORENS, D. M. *et al.* Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. **Jornal of Clinical Microbiology**, v. 22, p. 250-254, 1985.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 3, p. 13-22, 2005.

MURPHY, F. A. **Togavirus morphology and morphogenesis. In The Togaviruses. Biology, Structure, Replication.** Edited by R. W. Schlesinger. New York: Academic Press, p.241-316, 1980.

NAYAK, V. *et al.* Crystal structure of dengue virus type 1 envelope protein in the postfusion conformation and its implications for membrane fusion. **Journal of Virology**, v. 83, p. 4338-4344, 2009.

NOGUEIRA, R. M.; DE ARAÚJO J. M.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 22, p. 358-363, 2007.

NOGUEIRA, R. M. *et al.* Dengue virus type 3 in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 925-926, 2001

NOGUEIRA, R. M. *et al.* Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 253, 1990.

NOISAKRAN, S. *et al.* Characterization of dengue virus NS1 stably expressed in 293T cell lines. **Journal of Virological Methods**, v. 142, p. 67-80, 2007.

NYBAKKEN, G. E. *et al.* Crystal structure of the West Nile virus envelope glycoprotein. **Journal of Virology**, v. 80, p. 11467-11474, 2006.

OLIVEIRA DE PAULA, S. *et al.* Improved detection of dengue-1 virus from IgM-positive serum samples using C6/36 cell cultures in association with RT-PCR. **Intervirolgy**, v. 46, p. 227-231, 2003.

OSANAI, C. H. *et al.* Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 25, p. 53-4, 1983.

PARK, H. J. *et al.* Optimization of transfection conditions for expression of green fluorescent protein in *Drosophila melanogaster* S2 cells. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 25, p.558–563, 1999.

PARK, J. H. *et al.* Functional expression of recombinant human ribonuclease/angiogenin inhibitor in stably transformed *Drosophila melanogaster* S2 cells. **Cytotechnology**, v. 57, p. 93-99, 2008.

PERERA, R.; KUHN, R. J. Structural proteomics of dengue virus. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p. 369-377, 2008.

PERERA, R.; KHALIQ, M.; KUHN, R. J. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. **Antiviral Research**, v. 80, p. 11-22, 2008.

PERRET, B. G. *et al.* Expression of EGFP-amino-tagged human mu opioid receptor in *Drosophila* Schneider 2 cells: a potential expression system for large-scale production of G-protein coupled receptors. **Protein Expression Purification**, v. 31, p. 123-132, 2003.

PIERSON, T. C. *et al.* The stoichiometry of antibody-mediated neutralization and enhancement of West Nile virus infection. **Cell Host & Microbe**, v. 1, p. 135-145, 2007.

PINCUS, S. *et al.* Recombinant vaccinia virus producing the prM and E proteins of yellow fever virus protects mice from lethal yellow fever encephalitis. **Virology**, v. 187, p. 290-297, 1992.

POERSCH, C. O. *et al.* Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. **Journal of Clinical Virology**, *In Press*, 2005.

PURDY, D. E.; CHANG, G. J. Secretion of noninfectious dengue virus-like particles and identification of amino acids in the stem region involved in intracellular retention of envelope protein. **Virology**, v. 333, p. 239-250, 2005.

PUTNAK, R. *et al.* Dengue-1 virus envelope glycoprotein gene expressed in recombinant baculovirus elicits virus-neutralizing antibody in mice and protects them from virus challenge. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, p. 159-167, 1991.

PUTNAK, R. *et al.* An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model. **Vaccine**, v. 23, p. 4442-4452, 2005.

RACE, M. W.; WILLIAMS, M. C.; AGOSTINI, C. F. Dengue in the Caribbean: virus isolation in a mosquito (*Aedes pseudoscutellaris*) cell line. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, p. 18-22, 1979.

RAO, B. L. Plaque formation of dengue viruses in Vero cell culture under carboxymethylcellulose overlay. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 64, p. 1709-1712, 1979.

RAVIPRAKASH, K. *et al.* Needle-free Biojector injection of a dengue virus type 1 DNA vaccine with human immunostimulatory sequences and the GM-CSF gene increases immunogenicity and protection from virus challenge in Aotus monkeys. **Virology**, v. 315, p. 345-52, 2003.

REED, W.; CARROLL, J. The etiology of yellow fever: a supplemental note. 1902. **Military Medicine**, v. 166, p. 62-66, 2001.

REY, F. A. *et al.* The envelope glycoprotein E from tick-borne encephalitis virus as 2A resolution. **Nature**, v. 375, p. 291-98, 1995.

RICE, C. M. *Flaviviridae: The viruses and their replication*. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. & HOWLEY, P. M. **Virology**, p. 931-960. New York: Raven Press, 1996.

RODHAIN, F. The role of monkeys in the biology of dengue and yellow fever. **Comparative Immunology and Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14, p. 9-19, 1991.

ROEHRIG, J. T.; BOLIN, R. A.; KELLY, R. G. Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. **Virology**, v. 246, p. 317-328, 1998.

RUSH, B. An account of the bilious remitting fever as it appeared in Philadelphia, in the summer and autumn of the year 1780. **Medical Inquiries and Observations**. Philadelphia: Prichard and Hall, p. 104–117, 1789.

SABIN, A. B. Research on dengue during World War II. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1, p. 30-50, 1952.

SALUZZO, J. F. *et al.* Use of stabilized yellow fever vaccine 17D at the time of the yellow fever epidemic in Burkina Faso in 1983. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales**, v. 78, p. 536-540, 1985.

SANTOS, M. G. *et al.* Improving heterologous protein expression in transfected *Drosophila* S2 cells as assessed by EGFP expression. **Cytotechnology**, v. 54, p. 15-24, 2007.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro--1986. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p. 245-246, 1986.

SCHLESINGER, J. J.; BRANDRISS, M. W.; WALSH, E. E. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. **Journal of General Virology**, v. 68, p. 853-857, 1987.

SCHNEIDER, I. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 27, p.



353-365, 1972.

SHIN, H. S.; CHA, H. J. Facile and statistical optimization of transfection conditions for secretion of foreign proteins from insect *Drosophila* S2 cells using green fluorescent protein reporter. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 1187-1194, 2002.

SHIRYAEV, S. A. *et al.* Cleavage targets and the d-arginine-based inhibitors of the West Nile virus NS3 processing proteinase. **Biochemistry Journal**, v. 393, p. 503–511, 2006.

SHU, P. Y. *et al.* Dengue NS1-specific antibody responses: isotype distribution and serotyping in patients with Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever. **Journal of Medical Virology**, v. 62, p. 224-232, 2000.

SHU, P. Y. *et al.* Potential application of nonstructural protein NS1 serotype-specific immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay in the seroepidemiologic study of dengue virus infection: correlation of results with those of the plaque reduction neutralization test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1840-1844, 2002.

SHU, P. Y. *et al.* Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p. 2408-2416, 2003.

SHU, P. Y. *et al.* Dengue virus serotyping based on envelope and membrane and nonstructural protein NS1 serotype-specific capture immunoglobulin M enzyme linked immunosorbent assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 2489- 94, 2004.

SHU, P. Y.; HUANG, J. H. Current advances in dengue diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 642-650, 2004.

SILER, J.; HALL, M. W.; HITCHENS, A. P. Dengue: Its history, epidemiology, mechanism of transmission, etiology, clinical manifestations, immunity and prevention. **Philippine Journal of Science**, v. 29, p.1-304, 1926.

SIMMONS, M. *et al.* Evaluation of recombinant dengue viral envelope b domain protein antigens for the detection of dengue complex-specific antibodies **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 2, p. 144–51, 1998.

STADLER, K. *et al.* Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin.

**Journal of Virology**, v. 71, p. 8475-8481, 1997.

STAROPOLI, I. *et al.* Affinity-purified Dengue-2 virus Envelope glycoprotein induces neutralizing antibodies and protective immunity in mice. **Vaccine**, v. 15, n. 17/18, p. 1946-54, 1997.

STOKES, A.; BAUER, J. H.; HUDSON, N. P. Experimental transmission of yellow fever to laboratory animals. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 8, p. 103–164, 1928.

SUGRUE, R. J. *et al.* The production of recombinant dengue virus E protein using *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods**, v. 69, p. 159-169, 1997.

TALARMIN, A. *et al.* Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1189-1192, 1998.

TESH, R. B. A method for the isolation and identification of dengue viruses, using mosquito cell cultures. The **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 28, p. 1053-1059, 1979.

THEILER, M.; SMITH, H. H. The effect of prolonged cultivation in vitro upon the pathogenicity of yellow fever virus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 65, p. 767–786, 1937.

THOMAS, S. J.; STRICKMAN, D.; VAUGHN, D. W. Dengue epidemiology: virus epidemiology, ecology, and emergence. **Advances in Virus Research**, v. 61, p. 235-289, 2003.

THROSBY, M. *et al.* Isolation and characterization of human monoclonal antibodies from individuals infected with West Nile Virus. **Journal of Virology**, v. 80, p. 6982-6992, 2006.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceeding of the National Academy Sciences of the U.S.A.** v. 76, p. 4350-4, 1979.

VALLE, M. A. *et al.* Production and purification of human menin from *Drosophila melanogaster* S2 cells using stirred tank reactor. **Cytotechnology**, v. 35, p. 127-135, 2001.

VALLE, R. P.; FALGOUT, B. Mutagenesis of the NS3 protease of dengue virus type 2. **Journal of Virology**, v. 72, p. 624-632, 1998.

VASCONCELOS, P. F. C. Yellow Fever. **Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical**, v 36(2), p 275-93, 2003.

VÁZQUEZ, S. *et al.* Immune response to synthetic peptides of dengue prM protein. **Vaccine**, v. 20, p. 1823-1830, 2002.

VÁZQUEZ, S. *et al.* Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 33, p. 132-137, 2005.

VORNDAM, V.; KUNO, G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. **Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever**, New York: CAB International, 1997.

WANG, S. H. *et al.* Intracellular localization and determination of a nuclear localization signal of the core protein of dengue virus. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 3093-4102, 2002

WEAVER, S. C.; BARRETT, A. D. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 2, p. 789-801, 2004.

WENGLER, G.; WENGLER, G. The carboxy-terminal part of the NS3 protein of the West Nile flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA- stimulated NTPase. **Virology**. n. 184, p. 707-715, 1991.

WESTAWAY, E. G. Flavivirus replication strategy. **Advances in Virus Research**, v. 33, p. 45-90, 1987.

WESTAWAY, E. G.; MACKENZIE, J. M.; KHROMYKH, A. A. Kunjin RNA replication and applications of Kunjin replicons. In: CHAMBERS, T.J. & MONATH, T.P. **Advances in Virus Research, The Flaviviruses: Detection, Diagnosis and Vaccine Development**, California: Elsevier Academic Press, vol. 59, p.235-289, 2003.

WHITEHEAD, S. S. *et al.* A live, attenuated dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the 3' untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. **Journal of Virology**, v. 77, p. 1653-1657, 2003.

WHITEHEAD, S. S. *et al.* Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 5, p. 518-528, 2007.

WHO (World Health Organization). Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, **treatment, prevention and control**. 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 1997.

WINKLER, G. *et al.* Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. **Virology**, n. 162, p. 187-96, 1988.

WINKLER, G. *et al.* Newly synthesized dengue -2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane associated after dimerization. **Virology**, n. 171, p. 302-5, 1989.

XU, H. *et al.* Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44 (8), p. 2872-8, 2006.

YIN, Z. *et al.* Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 2: SAR study of tetrapeptide aldehyde inhibitors. **Bioorganic & Medical. Chemistry Letters**, v. 16,p. 40–43, 2005a.

YIN, Z. *et al.* Peptide inhibitors of Dengue virus NS3 protease. Part 1.: Warhead. **Bioorganic & Medical. Chemistry Letters**, v. 16,p. 36–39, 2005b

YOKOMIZO, A. Y. *et al.* ant protein in stable co-transfected cell line. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 102-109, 2007.

YOUNG, P. R. *et al.* An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1053–1057, 2000.

YUSOF, R. *et al.* Purified NS2B/NS3 serine protease of dengue virus type 2 exhibits cofactor NS2B dependence for cleavage of substrates with dibasic amino acids in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 9963–9969, 2000.

ZANOTTO, P. M. A. *et al.* Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 548-553, 1996.

ZHANG, F. *et al.* Expression of particulate-form of Japanese encephalitis virus envelope protein in a stably transfected *Drosophila* cell line. **Virology Journal**, v. 26, p. 4-17, 2007.

ZHANG, Y. M. *et al.* Immunization of mice with dengue structural proteins and nonstructural protein NS1 expressed by baculovirus recombinant induces resistance to dengue virus encephalitis. **Journal of virology**, v. 62, p. 3027-3031, 1988.

ZHANG, Y. *et al.* Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. **Structure**, v. 12, p.1607-1618, 2004.